



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

2013

**Diana Margarida  
Silva Almeida**

## **Contaminação microbiológica de alimentos: o caso particular de *E. coli***





**Diana Margarida  
Silva Almeida**

## **Contaminação microbiológica de alimentos: o caso particular de *E. coli***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Gil, Professor associado com Agregação, do Departamento de química da Universidade de Aveiro e da Doutora Daniela Leite, Diretora Técnica do laboratório YourLab Segurança Alimentar na empresa VLM Consultores, S.A..



## **O júri**

### **Presidente**

**Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**  
Professor Associado com Agregação, Departamento de Química,  
Universidade de Aveiro

### **Arguente**

**Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**  
Professora Associada com Agregação, Departamento de Química,  
Universidade de Aveiro

### **Orientador interno**

**Professora Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil**  
Professora Associada com Agregação, Departamento de Química,  
Universidade de Aveiro

### **Orientador externo**

**Dr<sup>a</sup> Daniela Costa Leite**  
Directora Técnica YourLAB Segurança Alimentar, VLM Consultores,  
Aveiro



## **Agradecimentos**

À Professora Ana Gil, pela orientação deste trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos. Sem a sua ajuda este desafio final do meu percurso académico seria muito mais complicado. A si, o meu sincero agradecimento.

À Dr. Daniela Leite por toda a disponibilidade, ajuda e transmissão do seu conhecimento ao longo de todo o trabalho experimental. Muito obrigada pela boa disposição de todos os dias.

Aos meus pais e irmão, e aos meus amigos, por acreditarem sempre em mim, pelo apoio incondicional e pela força que me transmitiram ao longo de todo este percurso académico. Muito obrigada.





## Abreviaturas

ALOA	Agar Listeria Ottavani & Agosti
ATP	Adenosina Tri-fosfato
$a_w$	Water activity
BP	Baird-Parker
CDC	Centers for Disease Control
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
ELFA	Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
GMP	Good Manufacturing Practices
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISO	Internacional Standard Organization
MKTTn	Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin
MO	Microrganismo
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
RELACRE	Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
RNA	Ácido Ribonucleico
RV	Rappaport-Vassiliadis
SS	Salmonella e Shigella agar
TBX	Tryptone Bile X-glucuronide
TSC	Tryptone Sulfite Cycloserine
TTC	Triphenyl Tetrazolium Chloride
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VRBG	Violet Red Bile Glucose
VRBL	Violet Red Bile Lactose
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose lysine deoxycholate



## Palavras-chave

*Escherichia coli*, Carne picada, Segurança alimentar, Bactérias patogénicas, Microrganismos indicadores

## Resumo

Quando alimentos contaminados por *Escherichia coli* (*E. coli*) são ingeridos, podem manifestar-se várias doenças provocadas pela bactéria ou por toxinas por ela produzidas. Para além de poder constituir uma ameaça à saúde do consumidor, a presença de *E. coli* em alimentos pode ser indicativa de contaminação fecal e de processos de higienização inadequados. Pelas suas características nutricionais, pH e água disponível, a carne picada é um alimento particularmente suscetível a contaminação microbiológica, principalmente pela bactéria *E. coli*. Devido a este facto, é exigido por decreto-lei descrito na Portaria 699:2008 “Ministérios da economia e da inovação e da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas”, que os estabelecimentos comerciais de venda de carnes realizem mensalmente ensaios de enumeração desta bactéria em amostras de carne picada, devendo ser avaliadas 5 amostras por cada estabelecimento. De acordo com esta legislação, o conjunto das amostras é considerado insatisfatório se alguma delas apresentar concentrações de *E. coli* superiores a  $5,0 \times 10^2$  UFC/g ou se mais do que 2 amostras apresentarem concentrações entre  $5,0 \times 10^1$  e  $5,0 \times 10^2$  UFC/g. Desta forma, numa primeira parte do trabalho do presente estágio (que englobou o período de outubro de 2012 a maio de 2013), foi feita uma avaliação da incidência de *E. coli* em carnes picadas provenientes de 22 talhos diferentes, da região de Aveiro, no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013. No conjunto dos 22 talhos, foram encontrados níveis da bactéria *E. coli* em não conformidade com a legislação vigente em 25% das avaliações mensais das amostras de carne picada. Em 2 dos 22 talhos, foi verificado um número máximo de 9 meses em que as amostras apresentaram resultados insatisfatórios, enquanto em apenas um talho foi verificada a conformidade das amostras em todos os meses considerados neste estudo.

Nos vários estabelecimentos, em cada mês considerado, foram verificadas apenas algumas correlações entre valores indicativos de higienização inadequada de superfícies e manipuladores, e amostras de carne picada em não-conformidade. Tal averiguação é indicativa de que a maioria das contaminações tem origem em processos anteriores à chegada da carne ao estabelecimento, como o processo de abate dos animais, processamento das carcaças e/ou aplicação de temperaturas inadequadas durante o armazenamento e transporte da carne.

Uma segunda parte do trabalho no laboratório *YourLAB Segurança Alimentar* consistiu em avaliar a presença de microrganismos indicadores e microrganismos patogénicos, em



alimentos confeccionados e frescos, recolhidos entre julho de 2011 e fevereiro de 2013 em diversos estabelecimentos distintos. Não foram detetados microrganismos patogénicos nas amostras de refeições e produtos alimentares analisados, com as exceções de uma amostra de requeijão em que foi detetada e confirmada a presença de *Salmonella spp*, e de algumas das amostras analisadas ao longo do período considerado, em que foi detetada a presença de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores. Destas últimas amostras fazem parte produtos confeccionados como um pastel bola de Berlim e frango estufado com batata e legumes, e produtos frescos, ou ainda crus, como croissants de ovo e de chocolate congelados. Relativamente a microrganismos indicadores, foram encontradas algumas amostras (de produtos confeccionados e produtos frescos) insatisfatórias de acordo com os valores guia publicados em Portugal, pelo Instituto Nacional de Saúde de Dr. Ricardo Jorge, podendo indicar a ocorrência de contaminação fecal, uma confeção inadequada do produto, e/ou uma contaminação pós-confeção.



## Key-words

*Escherichia coli*, Minced meat, Food safety, Pathogenic bacterium, Indicator microorganisms

## Abstract

When food contaminated with *Escherichia coli* (*E. coli*) is ingested, several diseases caused by the bacteria itself or by the toxins it produces may occur. Moreover, the presence of *E. coli* in foods may be indicative of inadequate hygiene processes. Minced meat is particularly susceptible to microbiological contamination by *E. coli*, due mostly to their available nutrients and water, and  $a_w$ . Therefore, the Portuguese law expressed in Portaria 699:2008 – “Ministérios da economia e da inovação e da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas”, requires the enumeration of this bacteria in 5 samples of minced meat, each month, in each commercial establishment. Accord to this law, the samples are in non compliance if more than two samples exhibit a concentration of *E. coli* between  $5,0 \times 10^1$  e  $5,0 \times 10^2$  CFU/g, or if any sample exceed the value  $5,0 \times 10^2$  CFU/g. In the first part in this study, an assessment of the incidence of *E. coli* in minced meat was carried out for 22 different butchers, in the Aveiro region, from July of 2011 to February of 2013. Considering all collection sits, 25% of the samples have shown to be in non-compliance with current legislation. The number of occurrences of non-conforming minced meat samples reached a maximum of 9 in 2 of the 22 the butchers, whereas only one butcher showed all results satisfactory during the study period. The possibility of unacceptable values of *E. coli* in ground beef correlated with unsatisfactory values in surface and handlers swabs (indicative of poor sanitation) was investigated, but found not the be the case. This finding is indicative that most of the contamination originates in processes prior to the arrival of the meat at the butcher store, like the process of slaughter and application of inappropriate temperatures during storage and transportation of meat.

A second part of the study work carried out in the laboratory *YourLAB S. A.*, consisted in the assessment of the indicator microorganisms incidence and the presence of pathogenic microorganisms in several types of fresh and cooked food samples, collected in various commercial establishments between July 2011 and February of 2013. No pathogens were detected in meal and other food samples, with the exceptions of one sample of cottage cheese in which was confirmed the presence of *Salmonella spp.* and the presence of sulphite-reducing *Clostridium* spores in some samples over the period considered. Those samples included cooked products like a cake “bola de berlim” and stewed chicken with potatoes and vegetables, and fresh products such as frozen croissants. Unsatisfactory values of indicator microorganisms were





found in some samples of both cooked and fresh products, according to the table of guide values published in Portugal, by the “Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge”, indicating fecal contamination, inadequate cooking or a post-processing infection.



## Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	vii
1. Objetivos deste trabalho.....	xvi
2. Revisão bibliográfica.....	1
2.1. Microbiologia nos alimentos.....	1
2.2. Microrganismos patogénicos de maior impacto e doenças associadas.....	1
2.3. Microrganismos indicadores.....	4
2.4. Fatores interferentes na sobrevivência e crescimento dos microrganismos.....	5
2.5. Legislação relevante no laboratório de Segurança e Qualidade Alimentar.....	9
2.5.1. Legislação relativa aos critérios de segurança alimentar .....	9
2.5.2. Legislação aplicada ao espaço e práticas laboratoriais.....	13
2.6. Contaminação de carne picada pela bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.6.1. Caracterização da bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.6.2. Serotipos patogénicos de <i>Escherichia coli</i> em carne fresca.....	18
2.6.3. Aspetos da contaminação por <i>Escherichia coli</i> em carne picada fresca.....	19
2.6.4. Legislação específica aplicada à pesquisa e deteção de <i>Escherichia coli</i> em carne picada.....	22
2.6.5. Método de enumeração de <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva e comparação com outros métodos.....	23
3. Metodologias aplicadas neste estágio.....	30
3.1. Colheita de amostras.....	31
3.2. Preparação das amostras: Solução-mãe e diluições sucessivas.....	32
3.3. Controlo de qualidade dos ensaios microbiológicos.....	33
3.4. Métodos de pesquisa de microrganismos.....	35
3.5. Métodos de contagem de microrganismos.....	39
3.5.1. Métodos gerais de contagem de microrganismos.. ..	39
3.5.2. Método de enumeração de <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva em carne picada.....	43
4. Resultados e discussão.....	44
4.1. Enumeração e avaliação da presença de <i>Escherichia coli</i> em carne picada.....	45
4.2. Enumeração e pesquisa de microrganismos em alimentos: resultados e discussão .....	57

4.2.1. Contagem de microrganismos em alimentos frescos e processados.....	57
4.2.2. Pesquisa de microrganismos em alimentos frescos e processados.....	63
5. Conclusões.....	66
6. Referências.....	68
Anexo I – Resultados relativos a enumeração de <i>E. coli</i> em carnes picadas dos diversos talhos, e enumeração de microrganismos a 30°C e enterobactérias em superfícies e manipuladores.....	75
Anexo II – Protocolo Experimental de Coloração de Gram.....	82
Anexo III – Protocolo Experimental de Teste de CAMP.....	83
Anexo IV – Protocolo Experimental de Teste Catalase.....	84

## Índice de figuras

Figura 1- Curva de crescimento representativa de uma cultura bacteriana. Totalidades de células, viáveis e inviáveis, em cada fase.....	6
Figura 2 – Grupos ecológicos com base na temperatura de adaptação. ....	7
Figura 3 – Diferentes relações e interações entre microrganismos no mesmo habitat.....	9
Figura 4 – Diagrama representativo da membrana exterior de <i>E. coli</i> , demonstrando a posição do antígeno O.....	16
Figura 5 - Tempo estimado de reportação de um caso de infecção por <i>E. coli</i> O157.....	19
Figura 6 – Citometria de fluxo: detecção automática de células individuais usando marcadores óticos fluorescentes.....	23
Figura 7 – Reação de Luciferina, na presença de ATP e oxigênio.....	24
Figura 8 - Fluxograma típico de um ensaio de FISH .....	25
Figura 9 – Reação de Polymerase Chain Reaction, utilizando um fluorocromo repórter e um fluorocromo quencher. ....	26
Figura 10 – Ensaio de Microarrays, comparando duas condições de teste. ....	27
Figura 11 – Formação de 5-bromo-4-cloro-indoxil a partir da atividade de $\beta$ -glucuronidase sobre a substância cromogénica 5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-glucuronide. Dimerização e oxidação de 5-bromo-4-cloro-indoxil, formando o dímero 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indogo.....	29
Figura 12 – Esquema resumo do método de pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. segundo a norma de referência ISO 6579:2002 “Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp.”.....	36
Figura 13 – Método resumido de pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 11290-1:1996 “Horizontal Method for the detection of <i>Listeria monocytogenes</i> ”.....	37
Figura 14 – Esquema de procedimentos de método padrão para pesquisa de esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores, segundo a norma NP 2262:1986 “Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores”.....	38

Figura 15 – Esquema representativo do procedimento descrito no método padrão de contagem de <i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva, realizado segundo a norma padrão ISO 16649-2:2001 “Regras gerais para a contagem de <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva”.....	44
Figura 16 - Percentagem de amostras nos respectivos intervalos de concentração de <i>E. coli</i> (UFC/g), relativas ao conjunto de amostras dos 22 talhos ao longo de 20 meses. ....	46
Figura 17 - Percentagem de meses com amostras em conformidade/não conformidade com os critérios estabelecidos na Portaria 699:2008, no conjunto dos 22 talhos. ....	46
Figura 18 - Conformidade das amostras de carne picada relativamente a contaminação por <i>E. coli</i> , em cada um dos estabelecimentos, no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013. Dados apresentados em ordem decrescente de acordo com o número de não-conformidades das amostras. ....	46
Figura 19 – Valores (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho 1, em cada mês de estudo.....	48
Figura 20 - Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de <i>E. coli</i> (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º1.....	48
Figura 21 - Valores (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de estudo.....	49
Figura 22 – Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de <i>E. coli</i> (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º14.....	49
Figura 23 - Valores (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho n.º 2, em cada mês de estudo.....	50
Figura 24 - Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de <i>E. coli</i> (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º 2.....	50
Figura 25 - Valores (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho n.º 7, em cada mês de estudo.....	51
Figura 26 - Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de <i>E. coli</i> (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º 7.....	51
Figura 27 - Concentração de microrganismos a 30°C em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.....	57
Figura 28 - Concentração de microrganismos a 30°C em alimentos frescos. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.....	58
Figura 29 - Concentração de enterobactérias em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.....	58
Figura 30 - Concentração de enterobactérias em alimentos frescos. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.....	59
Figura 31 - Concentração de bactérias coliformes em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.....	60

Figura 32 - Concentração de bactérias coliformes em alimentos frescos. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração. ....	60
Figura 33 - Concentração de <i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras nos intervalos de valores considerados satisfatórios e insatisfatórios.....	61
Figura 34 - Concentração de <i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva em alimentos frescos. Percentagem de amostras nos intervalos de valores considerados satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios. ....	61
Figura 35 - Concentração de estafilococos coagulase positiva em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras nos intervalos de valores considerados satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios. ....	63
Figura 36 - Percentagem de amostras com presença/ausência de esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores em alimentos frescos. ....	63
Figura 37 - Percentagem de amostras com presença/ausência de esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores em alimentos confeccionados. ....	64
Figura 38 - Percentagem de amostras com presença/ausência de <i>Salmonella</i> spp.....	65

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Exemplos de surtos alimentares ocorrentes nos últimos anos, em todo o mundo.....	2
Tabela 2 – Doenças, sintomas e alguns surtos associados, ocorrentes nos últimos 5 anos por todo mundo.....	4
Tabela 3 - Legislação aplicada no âmbito de segurança alimentar. ....	10
Tabela 4 – Grupos de alimentos prontos a comer, distintos em função do seu processamento e ingredientes. ....	12
Tabela 5- Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer.....	13
Tabela 6 – Diferentes estirpes patogénicas de <i>E. coli</i> , doenças e sintomas associados, e respetivos serotipos. ....	17
Tabela 7 – Registo de alimentos contaminados com diversos serotipos de <i>E. coli</i> .....	18
Tabela 8 – Características intrínsecas de técnicas utilizadas para deteção de patogénicos em alimentos. ....	28
Tabela 9 – Cuidados e material a ter em conta na recolha de vários tipos de amostras e respetivas normas de referência. ....	32
Tabela 10 – Processos internos e externos de controlo de qualidade realizados no laboratório <i>YourLAB S. A.</i> ....	34
Tabela 11 – Normas respetivas a métodos de referência para pesquisa de <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> e esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores. ....	35
Tabela 12 – Resumo de métodos de contagem de microrganismos: princípio do método, meio de cultura utilizada e condições de incubação. ....	41
Tabela 13 – Métodos de contagem de microrganismos em amostras de zaragatoas.....	42
Tabela 14- Métodos de enumeração de microrganismos em águas. ....	43

Tabela 15 - Concentração (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respectivas a superfícies e manipuladores, no talho 1, em cada mês de análise. ....	48
Tabela 16 - Concentração (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respectivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de análise.. ....	50
Tabela 17 – Concentração (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respectivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de análise. ....	51
Tabela 18 – Concentração (UFC/cm <sup>2</sup> ) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respectivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de análise. ....	52
Tabela 19 – valores de análises de zaragatoas respectivas à máquinas de moagem de carne picada, nos respectivos talhos, e comparação com conformidade das amostras de carne picada nos respectivos meses de análise. ....	55
Tabela 20 – Valores de concentração (UFC/cm <sup>2</sup> ) de enterobactérias e microrganismos a 30°C em superfícies e manipuladores dos 22 estabelecimentos. ....	56

## **1. Objetivos deste trabalho**

Os objetivos do presente estágio profissionalizante no laboratório de microbiologia alimentar *YourLAB Segurança Alimentar* consistiram principalmente no estudo e avaliação de resultados relativos ao ensaio de enumeração de *Escherichia coli*  $\beta$ -gucuronidase positiva, obrigatório pela Portaria 699:2008 relativa a “Ministérios da economia e da inovação e da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas”, em carne picada talhada em 22 estabelecimentos diferentes, da região de Aveiro, ao longo de 20 meses. Para além deste objetivo principal, também foi de interesse conhecer a realidade de um dia-a-dia num laboratório de análises a alimentos, águas e zaragatoas de superfícies e manipuladores, entrando em contacto com as metodologias de análise de todos os ensaios microbiológicos realizados, avaliando qual a percentagem de amostras de alimentos insatisfatórios relativamente a contaminação por microrganismos patogénicos e concentração de microrganismos indicadores, tendo sempre em conta a legislação vigente e aplicável ao ramo.



## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Microbiologia nos alimentos**

As contaminações microbiológicas em alimentos constituem um enorme risco para a saúde pública, devido à severidade de doenças causadas e ao grande número de alimentos e microrganismos que podem estar envolvidos. A *World Health Organization* (WHO) estima que as doenças provenientes da ingestão de água e alimentos causam morte de cerca de 2,2 milhões de pessoas anualmente, em todo o mundo, 1,9 milhões das quais sendo crianças (1). As doenças de origem alimentar são causadas através de três mecanismos diferentes: pela ingestão oral de microrganismos viáveis (infecção), pelas toxinas que eles produzem em quantidades suficientes para desenvolver uma patologia (intoxicação), ou por uma combinação destes mecanismos (toxicoinfecção) (2).

A Segurança Alimentar, nos dias de hoje, depara-se com vários desafios. Os produtos são comercializados e distribuídos por todo o mundo, desenvolvem-se cada vez mais técnicas de processamento para os produtos alimentares, o estilo de vida da população alterou-se pois cada vez mais se consomem refeições fora de casa e, para além disso, a esperança de vida mais alargada e o aumento de pessoas imunocomprometidas representam um largo número de população vulnerável para quem a segurança alimentar, ou falta dela, é uma ameaça severa. No entanto, a principal circunstância responsável pelo desenvolvimento de doenças de origem alimentar é o manuseamento do produto pelo Homem: a falta de higiene pessoal, a contaminação cruzada (contaminação de um alimento através de um equipamento já contaminado por um outro produto, por exemplo) e o uso de uma temperatura inadequada durante a confeção e a conservação dos produtos (3).

De momento são principalmente usados programas de *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) e *Good Manufacturing Practices* (GMP) para controlar os riscos microbiológicos em alimentos. Deve-se ter em conta que são elaborados com base em riscos conhecidos e não têm necessariamente em consideração futuros riscos potenciais que se possam vir a desenvolver. Particularmente, o programa de HACCP consiste na identificação, avaliação, controlo e prevenção de perigos em todos os estágios do processo de produção do alimento (3).

### **2.2. Microrganismos patogénicos de maior impacto e doenças associadas**

Entre os vários tipos de microrganismos que intervêm na contaminação de alimentos, as bactérias constituem o grupo mais importante, quer pela sua diversidade, quer pela sua frequente incidência nos alimentos, nos quais em condições favoráveis, são capazes de se multiplicar rapidamente originando doenças (4). É importante relembrar que o grupo das bactérias constitui um domínio dentro do “mundo” microbiano, que é dividido em filos, classes, ordens, famílias, géneros e espécies (5).

As doenças de origem alimentar são usualmente definidas como doenças de natureza infecciosa e/ou tóxica causadas por agentes (bactérias e/ou toxinas bacterianas) que entram no nosso corpo através da ingestão de alimentos (6). Durante 2008, foram registados 1034 surtos de origem alimentar, os quais resultaram em 23152 casos de doenças, 1276 hospitalizações e 22 mortes, nos Estados Unidos (7). Na tabela 1, encontram-se registos de surtos alimentares ocorrentes nos últimos anos, em todo mundo. Os alimentos responsáveis por cada surto são quase na totalidade alimentos frescos, não confeccionados.

Tabela 1 – Exemplos de surtos alimentares ocorrentes nos últimos anos, em todo o mundo. Adaptado de referência 8, com adição de informação das referências 9, 10 e 11.

Legenda: EUA: Estados Unidos da América

Patogénico	Alimento	Casos	Local	Ano
<i>Salmonella spp.</i>	Pimentões	1442 (2 mortes)	EUA, Canada	2008
	Manteiga de amendoim	714 (9 mortes)	EUA, canada	2008
	Papaia	106	EUA	2011
	Salmão fumado	1 026	Alemanha	2012
<i>Listeria spp.</i>	Queijo	21 (5 mortes)	Noruega	2007
	Produtos frescos cortados (aipo)	10 (5 mortes)	EUA	2010
	Melão	146 (31 mortes)	EUA	2011
<i>Escherichia coli</i>	Alface	134	EUA, Canada	2008
	Rebentos vegetais	3911 (47 mortes)	Europa	2011
	Morangos	15 (1 morte)	EUA	2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leite	24	Brasil	1994
	Carne	7	Canadá	2010
<i>Campylobacter jejuni</i>	Leite cru	18	Holanda	2007

De modo geral, as principais bactérias causadoras de surtos de origem alimentar são as *Salmonella spp.*, *Listeria spp.* e *Escherichia coli* (tabela 1), sendo que as doenças alimentares atualmente mais incidentes em todo o mundo são as salmonelose, listeriose e infeção por bactérias *Escherichia coli* (tabela 2). O Botulismo, causado por bactérias *Clostridium botulinum*, apesar de relativamente raro (sendo escassos os registos de alimentos contaminados) é uma doença que apresenta alta taxa de mortalidade. O *Clostridium botulinum* produz uma das mais potentes toxinas conhecidas, que as enzimas digestivas não têm capacidade de destruir, sendo absorvida pela corrente sanguínea e transportada por todo o organismo, podendo causar problemas musculares, de visão, dificuldade em falar, engolir, ou mesmo dificuldade em respirar, podendo levar a morte por falência respiratória. O botulismo ocorre em duas formas principais: intoxicação alimentar e botulismo infantil. (12). Em 2009, foram identificados em Portugal três casos de botulismo (13) e ainda outro de botulismo infantil (14) (tabela 2).

Quanto às bactérias do género *Salmonella*, estas são bacilos gram-negativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (designadas comumente por enterobactérias). O género de bactérias *Salmonella* abrange mais de 2500 espécies diferentes, mas a *Salmonella entérica* é considerada uma das mais importantes. A maioria das infeções causadas por bactérias deste género está associada com a ingestão de alimentos contaminados como ovos, carne, leite e derivados e vegetais, desenvolvendo assim as doenças de salmonelose ou ainda febre tifoide. Em caso de salmonelose, normalmente os pacientes apresentam gastroenterite, provocada por um endotoxina ou enterotoxina produzida pelas bactérias *Salmonella spp.* A febre tifoide, causada especificamente pela espécie *Salmonella typhimurium*, difere da salmonelose principalmente por se tratar uma infeção sistémica: após penetrarem a parede intestinal, as bactérias invadem a circulação sanguínea, onde sofrem lise pela ação de anticorpos, induzindo a libertação da endotoxina e o consequente desenvolvimento de febre elevada (12). Na Europa e Canadá foram reportados 1442 casos de salmonelose, dois dos quais resultaram em duas mortes (8), tal como se pode observar na tabela 2, e em Portugal foram registadas 220 doenças de salmonelose de 34 de febre tifoide (tabela 2) (13).

Relativamente ao género *Listeria*, foram identificadas até à data, seis diferentes espécies de bactérias, contudo, apenas a *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são consideradas virulentas, sendo a *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) mais emergente em alimentos (15). A *L. monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, não formadora de esporos, anaeróbica facultativa, que sobrevive e cresce a temperaturas de -0,4 a 50°C (16). Esta última foi isolada de uma variedade de alimentos como carne, produtos lácteos e vegetais, como se pode verificar na tabela 1. A doença provocada por esta bactéria denomina-se de listeriose, à qual deve ser dada especial atenção em mulheres grávidas infetadas porque a *L. monocytogenes* consegue atravessar a placenta e infetar o feto, resultando num aborto ou nascimento prematuro (15).

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é um habitante natural do trato intestinal da maioria dos animais e humanos, podendo facilmente incidir em carne e produtos derivados durante a evisceração de animais no matadouro, e ainda em outros alimentos como vegetais e água, através de contaminação fecal (15). Existem muitas estirpes variadas de *E. coli*, sendo algumas designadas patogénicas pela sua capacidade de produzir toxinas e outras pela infeção que a bactéria causa quando ingerida, tendo sido ainda reportada *E. coli* com genes de resistência a antibióticos (17). Os diferentes serotipos de *E. coli* e diferentes infeções associadas serão discutidos no subcapítulo 6.

Para além destas últimas bacterias patogénicas referidas (*Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli* e *Clostridium botulinum*), o laboratório *YourLAB Segurança Alimentar* também pesquisa e contabiliza outras clinicamente importantes, tal como bactérias do género *Staphylococcus*, entre outros, em todo o tipo de alimentos.

Dentro do género *Staphylococcus* (estafilococos, em linguagem comum), a bactéria *Staphylococcus aureus* é a espécie mais patogénica. Esta cresce bem em condições de

aerobiose e anaerobiose, tem elevada tolerância ao sal, e as toxinas produzidas por estas bactérias em multiplicação não alteram o sabor do alimento ou o cheiro. A enterotoxina produzida é muito estável ao calor, e aquando ingestão, provoca sintomas de má disposição, vômitos e diarreia, durante cerca de 24h (2).

Na tabela 2, encontram-se registos de doenças alimentares ocorrentes em todo o mundo, associadas com respetivos sintomas e bactéria patogénica.

Tabela 2 – Doenças, sintomas e alguns surtos associados, ocorrentes nos últimos 5 anos por todo mundo. Adaptada das referências 8 e 13, com adição de informação disponível nas referências 14, 19, 20 e 21.

Legenda: EUA: Estados Unidos da América

Doença	Patogénico	Doenças/Sintomas	Casos	Surtos	
				Ano	Localização
<b>Botulismo</b>	<i>Clostridium botulinum</i>	Paralisia muscular	20 (3 mortes)	2012	Arménia
			3	2009	Portugal
			1	2009	Portugal
<b>Botulismo infantil</b>					
<b>Salmonelose</b>	<i>Salmonella spp.</i>	Dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos.	1442 (2 mortes)	2008	EUA, Canadá
			220	2009	Portugal
			1026	2012	Holanda
<b>Febre Tifoide</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>		34	2009	Portugal
			503	2009	Reino Unido
<b>Listeriose</b>	<i>Listeria spp.</i>	Septicemia, meningoencefalite e infeções locais	394	2008	Alemanha
			146 (31 mortes)	2011	EUA
			14	2012	Finlândia
<b>Campilobacteriose</b>	<i>Campylobacter spp.</i>	Gastroenterite, diarreia, úlceras pépticas	5 106	2009	Espanha
			3 920	2009	Eslováquia
<b>Infeção por <i>Escherichia coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite, colite hemorrágica, síndrome urémica hemolítica, trombocitopenia trombótica púrpura	878	2009	Alemanha
			319	2012	Noruega
			75 (1 morte)	2011	EUA
			3 911 (47 mortes)	2011	Europa

### 2.3. Microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores representam certos grupos ou espécies de microrganismos, cuja presença em alimentos indica a possibilidade de ocorrência de contaminação de origem fecal ou declara a presença de patogénicos, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Idealmente, os microrganismos indicadores não são patogénicos, são

rapidamente detetáveis e enumeráveis, possuindo características típicas de sobrevivência semelhantes às de microrganismos patogênicos de importância (22).

Como exemplos de microrganismos indicadores podem ser citados aqueles que segundo a *International Commission on Microbiological Specifications* (ICMSF) podem ser agrupados em “microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde” (incluindo organismos mesófilos, psicrotróficos e termófilos, e bolores e leveduras), e em “microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde”, tais como bactérias do grupo coliformes totais e coliformes fecais, bactérias do gênero *Enterococcus*, bactérias da família *Enterobacteriaceae* e ainda a bactéria *Escherichia coli* (23). As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são consideradas características do trato intestinal embora não sejam o principal membro da microflora intestinal humana. As bactérias pertencentes a esta família estão distribuídas globalmente e são encontradas no solo, água, vegetação e no trato intestinal de animais. A presença destes microrganismos nos alimentos demonstra uma falha no processamento do alimento ou uma contaminação pós-processamento (23). Os coliformes fecais, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são capazes de fermentar lactose e produzir gás a 44,5°C em 24h, sendo a sua presença indicativa de contaminação pós-sanitização ou pós-processo muitas vezes causada por falta de higienização por parte dos manipuladores (24). Este grupo de coliformes compreende um número elevado de bactérias *E. coli*, embora a sua proporção exata seja desconhecida (3).

Entre estes organismos indicadores, a *E. coli* é muitas vezes preferida por ser a bactéria mais fiável para indicação de contaminação fecal, visto que é o único membro das bactérias coliformes que é encontrado exclusivamente nas fezes e não se multiplica apreciavelmente no ambiente (25). Contudo, estudos recentes sugeriram que esta bactéria não é um bom indicador em ambientes subtropicais e tropicais devido à sua capacidade de crescer em solos contaminados, nestes ambientes (26).

O gênero *Enterococcus* pertence a um grupo de microrganismos conhecidos como bactérias ácido lácticas. Estas bactérias são gram-positivas, não formadoras de esporos, com atividade catalase negativa, oxidase-negativa e são anaeróbicas facultativas. Apesar de serem habitantes naturais do trato gastrointestinal de animais e humanos, nem sempre são indicativos de contaminação fecal direta pois também têm ocorrência no solo, superfícies aquosas, vegetais e insetos. A resistência de bactérias do gênero *Enterococcus* a temperaturas de pasteurização e a sua adaptabilidade a diferentes substratos e diferentes condições de crescimento (temperaturas baixas e altas, pH extremos e salinidade) implica que podem ser encontrados em produtos alimentares com tratamento térmico (12, 27).

#### **2.4. Fatores interferentes na sobrevivência e crescimento dos microrganismos**

As condições que afetam o crescimento microbiano, principalmente das bactérias, são essencialmente a composição nutricional do seu meio envolvente e outros fatores ambientais como a temperatura, pH, gases ambientais, atividade da água ( $a_w$ ) e a presença de outros microrganismos. Os fatores ambientais afetam a função de enzimas metabólicas

das bactérias e, desta forma, a sobrevivência a um ambiente controverso depende da capacidade de adaptação dos sistemas enzimáticos das bactérias às alterações no seu habitat. As bactérias reproduzem-se rapidamente e muitas dividem-se mais do que uma vez em cada hora desde que as células estejam num ambiente que providencie nutrientes essenciais e condições físicas favoráveis ao crescimento. A duração do crescimento máximo é curta pois as bactérias, nesta fase, utilizam todos os nutrientes disponíveis e os produtos residuais gerados podem ser tóxicos. Desta forma, a população microbiana segue uma curva de crescimento típica como está indicada na figura 1, que expressa graficamente o número de células viáveis (expressas em unidade logarítmicas), traçado contra o tempo (horas). O crescimento tem progressão desde a fase *lag*, chegando à fase exponencial até a fase estacionária, antes de atingir a fase de morte celular (2).

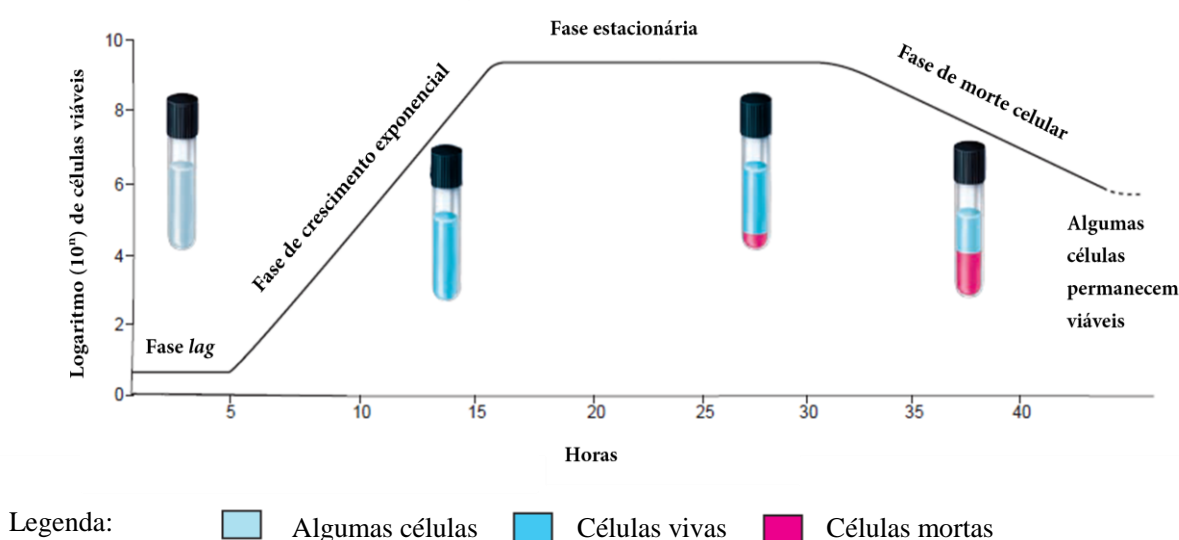


Figura 1- Curva de crescimento representativa de uma cultura bacteriana. Totalidades de células, viáveis e inviáveis, em cada fase. Adaptada de referência 2.

### Nutrientes

Os requisitos nutricionais de cada microrganismo dependem das capacidades metabólicas dos mesmos. Uma célula que é incapaz de sintetizar um nutriente essencial deve ser capaz de adquirir esse nutriente no seu meio de crescimento. As diferenças nos requisitos nutricionais das bactérias diferem particularmente na fonte de carbono e na capacidade de sintetizar aminoácidos, purinas, pirimidinas, e vitaminas. Ingredientes base de um meio perecível aos microrganismos consistem em carbono, azoto, fosforo, enxofre, alguns sais inorgânicos, e elementos essenciais (28).

### pH

A acidez ou alcalinidade de um meio tem uma grande influência no organismo das bactérias. Para a maioria das bactérias, o pH ótimo para crescimento encontra-se entre 6,5

e 7,5, e os limites normalmente rondam entre o 5 e 9. Um aspeto importante a notar é que o pH do meio pode alterar-se como resultado de atividades químicas da bactéria. Estas mudanças no pH podem ser tão elevadas que o crescimento do microrganismo pode ser eventualmente inibido (28).

### Temperatura

O padrão de crescimento das bactérias também pode ser profundamente influenciado pela temperatura, visto que esta condição tem interferência em reações químicas, sobre as quais dependem todos os processos. Com base na influência das temperaturas do meio, as bactérias podem ser divididas em três grandes grupos: psicrófilos, mesófilos, e termófilos (2). A maioria dos microrganismos clinicamente significativos são mesófilos, isto é, crescem a temperaturas intermédias, apresentando uma temperatura ótima entre 20°C e 40°C (figura 2), como é o caso da bactéria *E. coli* (2, 29). Um psicrófilo é um microrganismo cuja temperatura ótima de crescimento encontra-se inferior a 15°C, sendo mesmo capaz de crescer a 0°C. Bactérias como o *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, pertencem a este grupo pois estas são capazes de crescer em alimentos refrigerados (30, 31). Um termófilo é um microrganismo que apresenta valores de temperatura ótima de crescimento acima dos 45°C, não conseguindo sobreviver acima dos 60°C (2).

Na figura 2 encontram-se representados os diversos grupos, de acordo a taxa de crescimento em função da temperatura (2).

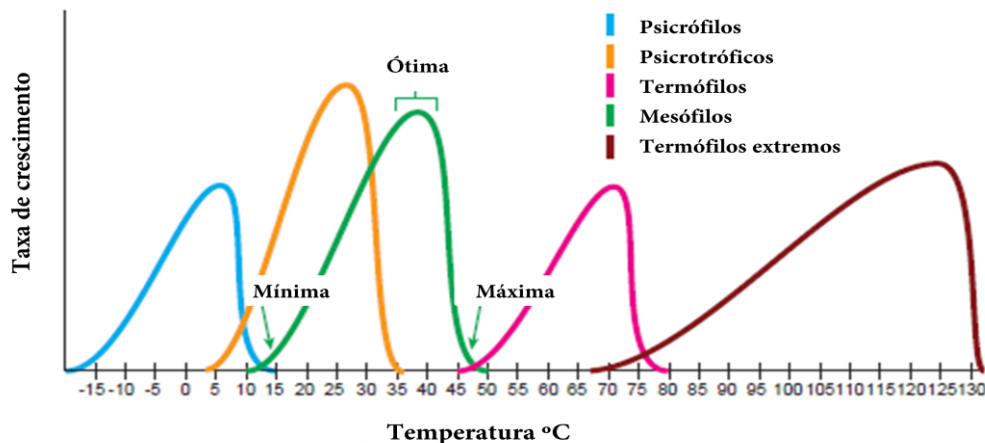


Figura 2 – Grupos ecológicos com base na temperatura de adaptação. Imagem adaptada de referência 2.

### ***Presença de gases***

Os principais gases que afetam o crescimento bacteriano são o oxigénio e o dióxido de carbono, tendo o oxigénio um maior impacto no crescimento de microrganismos. Em relação aos requisitos de oxigénio, são reconhecidas várias categorias: microrganismos aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos. Os microrganismos aeróbicos conseguem utilizar o oxigénio nos seus metabolismos e possuem enzimas necessárias para processar os produtos tóxicos do oxigénio, como o ião superóxido  $O_2^-$ , peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Um microrganismo anaeróbio tem falta de sistemas metabólicos enzimáticos para utilizar oxigénio na respiração e devido à falta de enzimas para processar o oxigénio tóxico, elas não conseguem tolerar qualquer oxigénio livre no ambiente e morrem se expostas a ele. Quanto aos microrganismos anaeróbios facultativos, estes não requerem oxigénio no seu metabolismo; utilizam-no quando este está presente, mas na sua ausência adotam um modo anaeróbico, como a fermentação. Um grande número de bactérias está inserido neste último grupo, como por exemplo bactérias gram-negativas intestinais e as bactérias *Staphylococcus* (2, 28).

### ***Atividade da água***

A atividade da água ( $a_w$ ) é um parâmetro com grande influência no crescimento e multiplicação dos microrganismos em alimentos. Este parâmetro representativo da água disponível, é expresso pela equação:  $a_w = p/p_0$ , onde  $p$  representa a pressão do vapor de água na substância, e  $p_0$  a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura. Os microrganismos obtêm quase todos os seus nutrientes em solução a partir da água envolvente nos alimentos (5). Num sistema alimentar, se a atividade da água de um microrganismo é mais baixa do que a do alimento, a água é absorvida e desta forma as espécies podem se multiplicar e crescer; no entanto, se a atividade da água do próprio microrganismo for mais elevada, o organismo desidrata e torna-se dormente ou morre (2).

### ***Presença de outros microrganismos***

Outro fator com influência no crescimento e sobrevivência de microrganismos pertence à presença de outros microrganismos no meio em que se encontram, e as relações estabelecidas entre eles (figura 3) (2).

As relações entre as diferentes populações de microrganismos podem ter efeitos benéficos, prejudiciais ou não ter efeitos particulares para o organismo envolvido, podem ser obrigatórias (simbióticas) ou não obrigatórias (assimbióticas) para os membros (figura 3). Dentro do grupo das relações simbióticas o mutualismo diz respeito a relações obrigatórias, mas benéficas, entre populações, enquanto o comensalismo designa uma relação obrigatória em que um membro é beneficiado e o outro não é beneficiado nem prejudicado. Por outro lado, as relações assimbióticas dizem respeito a relações entre microrganismos livres, como o antagonismo, em que o crescimento de uma das populações



é inibido pela outra, e o sinergismo, em que as populações cooperam entre si para produzir um resultado que nenhuma conseguiria sozinha, como por exemplo os biofilmes (2).

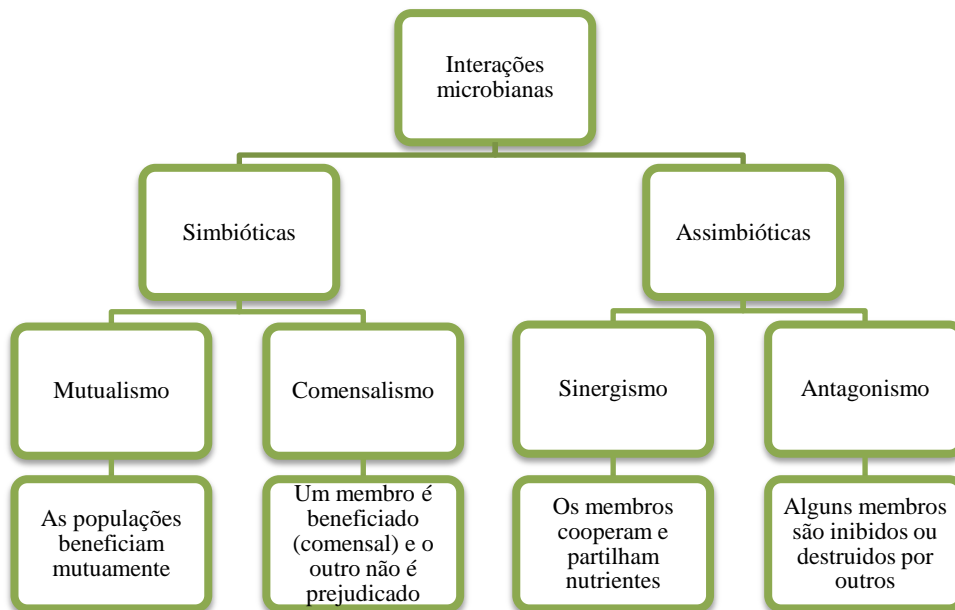


Figura 3 – Diferentes relações e interações entre microrganismos no mesmo habitat. Adaptada de referência 2.

Para avaliar o risco quantitativo de patogênicos ocorrentes em alimentos, vários e diversificados modelos matemáticos têm sido desenvolvidos com o intuito de perceber a dinâmica do crescimento microbiano, a sua sobrevivência e morte, nos alimentos. Os mais interessados podem estender a leitura, consultando as referências 32, 33 e 34.

## 2.5. Legislação relevante no laboratório de Segurança e Qualidade Alimentar

### 2.5.1. Legislação relativa aos critérios de segurança alimentar

Há muito que a segurança alimentar consiste numa questão importante para a sociedade, verificando-se uma crescente preocupação dos consumidores a este nível, tornando-os cada vez mais exigentes com os produtos e serviços que lhes são fornecidos. Para ir de encontro a esta preocupação, tem sido publicado um conjunto de legislações, tanto a nível internacional, europeu e nacional (como se resume na tabela 3, elaborada a partir das referências 35-39).

Com a globalização e a internacionalização das empresas, a seleção das normas para implementação, tornou-se numa questão complexa, fazendo por vezes com que a mesma organização tenha vários sistemas implementados e até vários sistemas certificados com a mesma finalidade: a segurança alimentar. É neste contexto que, em Setembro de 2005, a agência *International Standard Organization* (ISO) e a *European Committee for Standardization* (CEN) publicaram uma norma - EN ISO 22000:2005 “Food Safety Management systems - Requirements for any organization in the food chain”. Esta Norma

Internacional especifica os requisitos para um sistema de gestão da segurança alimentar combinando os elementos chave, geralmente reconhecidos como essenciais, que permitem garantir a segurança dos géneros alimentícios ao longo da cadeia alimentar, até ao seu consumo final (40). Contudo, apesar do aparecimento de uma norma de âmbito internacional, contrariamente ao expectável, nenhuma das restantes normas de agências, como o *International Food Standard* (IFS) ou o *British Retail Consortium* (BRC), foram extintas. As empresas com presença no mercado internacional podem avançar com a implementação da norma EN ISO 22000:2005 mas, ao mesmo tempo, devem ter a preocupação em integrar os requisitos impostos pelos mercados onde atuam, como o BRC exigido pelo Reino Unido e alguns países nórdicos ou o IFS solicitado pela distribuição alemã e francesa. A solução passa por contemplar diferentes combinações das mais diversas normas aplicáveis ao sector alimentar e que vão desde a simples integração dos sistemas de gestão EN ISO 22000:2005 à integração de um complexo conjunto de referenciais possibilitando às organizações escolherem a combinação mais adequada à realidade das suas atividades e ao conjunto de solicitações do mercado onde atuam (41).

Tabela 3 - Legislação aplicada no âmbito de segurança alimentar.

	Norma	Designação	Objetivos/Princípio	Fonte
<b>Internacional</b>	EN ISO 22000:2005	Sistemas de gestão da segurança alimentar	Harmoniza as normas de segurança alimentar por todo o mundo; Especifica os requisitos para sistemas de gestão de segurança alimentar, incorporando todos os elementos de programas como HACCP e GMP.	(35)
<b>Europeia</b>	Regulamento (CE) n.º 178	-	Determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, Cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos; Estabelece procedimentos relativos à segurança dos géneros alimentícios.	(36)
<b>Nacional</b>	Decreto-lei n.º 113	Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas	Assegura a execução e o cumprimento, no ordenamento jurídico nacional, das obrigações decorrentes dos Regulamentos (CE) n.º 852:2004 e n.º 853:2004, ambos do Parlamento Europeu.	(37)
<b>Alemanha França</b>	IFS	International food standard	Visa estabelecer uma norma comum com um sistema de avaliação uniforme; trabalhar com entidades acreditadas e certificadas e auditores qualificados; assegurar compatibilidade na cadeia de transportadores; Tem o intuito de reduzir os custos para os fornecedores e retalhistas.	(38)
<b>Reino Unido</b>	BRC	British Retail Consortium	Especifica critérios de segurança, qualidade e operacionais necessários para os operadores no sector alimentar para garantir o cumprimento das obrigações regulamentares e proteger os consumidores.	(39)

Para ir de encontro a esta preocupação de segurança alimentar e com o intuito de harmonizar os critérios microbiológicos na União Europeia, assim como procedimentos relativos a higienização de géneros alimentícios, foi publicado um conjunto de legislações, destacando-se o Regulamento (CE) n.º 178:2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos relativos à avaliação da segurança dos géneros alimentícios, e os Regulamentos (CE) n.º 852:2004 e n.º 853:2004, relativos à higiene dos géneros alimentícios e à higiene dos géneros alimentícios de origem animal, respetivamente, indicando as práticas laboratoriais avaliadoras destes parâmetros (40). As análises laboratoriais aplicam-se a produtos no fim do processo de fabrico ou aos produtos colocados no mercado, incluindo o mercado retalhista até ao consumidor, e são também aplicáveis nos pontos de entrada do território europeu aos produtos importados de países terceiros e no comércio intracomunitário. Estas normas fixam um valor limite de resultado da análise, acima do qual um género alimentício deve ser considerado inaceitavelmente contaminado com os microrganismos a que os critérios se referem (42, 43). Os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar que os géneros alimentícios cumpram os critérios microbiológicos pertinentes estabelecidos no anexo I do Regulamento (CE) n.º 853:2004 e, quando necessário, devem-se realizar estudos em conformidade com o anexo II desta mesma norma, a fim de verificar se os critérios são cumpridos durante todo o período de vida útil dos produtos, como por exemplo, a avaliação do crescimento ou sobrevivência dos microrganismos suscetíveis de estar presentes no produto durante o seu período de vida útil, em condições de distribuição, armazenagem e utilização. Os critérios de higiene dos processos são geralmente usados na monitorização do processo de preparação e transformação, sendo indicativos das Boas Práticas de Higiene e do correto funcionamento do sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) (44).

A publicação destes regulamentos da Comissão Europeia é complementada em direito português pelo Decreto-Lei n.º 113/2006 (relativo ao Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas) que indica quais as autoridades competentes, os códigos nacionais de boas práticas, fiscalização e contraordenações. Tendo isto em consideração, os alimentos e as rações para animais, produzidos em Portugal ou importados de países terceiros (não pertencentes ao Mercado Único) para o nosso país, devem satisfazer a legislação alimentar atual, quer comunitária quer nacional, e respeitante à sua segurança (42).

Contudo, a legislação portuguesa é omissa no que se refere à grande maioria dos produtos prontos a comer, sendo utilizados valores guia para apreciação de resultados analíticos, ou seja, valores limite, a partir dos quais as determinações microbiológicas quantitativas e qualitativas permitem qualificar o produto segundo níveis de qualidade/segurança. Estes valores guia foram publicados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), num documento traduzido e adaptado do guia “Guidelines for Food Safety Control in European Restaurants”, parte do projecto “European Union Risk Analysis Information Network” (EU-RAIN) (45).

Os dados obtidos pelo INSA ao longo dos anos permitiram o agrupamento dos alimentos prontos a comer em três grupos diferentes, de acordo com o tipo de ingredientes que entram na sua composição, e o procedimento que lhe é aplicado (tabela 4). Para cada análise de contagem e pesquisa de microrganismos, foram criados valores limite para 4 níveis diferentes de aceitabilidade, conforme se podem visualizar alguns exemplos na tabela 5, que demonstra apenas os limites com relevância para os ensaios realizados no presente estágio.

Tabela 4 – Grupos de alimentos prontos a comer, distintos em função do seu processamento e ingredientes. Adaptado de referência 45.

Grupo	Produto	Exemplos
1	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada	Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Pastéis de bacalhau/Croquetes/ Rissóis Sandes de carne assada Sandes de <i>pâté</i> de atum (maionese industrial) Omeleta de Queijo /fiambre <i>Mousse</i> de chocolate instantânea Bolo de chocolate Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/fruta laminada em calda
2	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão-frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás c/ salsa crua e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos <i>Mousse</i> de chocolate Pudins com fruta ao natural Salada de fruta em calda adicionada de fruta ao natural
3	Saladas/ Vegetais/Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos

Tabela 5- Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir. Adaptada de referência 45.

Legenda: NA – Não aplicável

Microrganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
<b>Microrganismos a 30°C</b>	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
<b>Coliformes totais</b>	1	$\leq 10$	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
	2	$\leq 10$	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<b><i>Escherichia coli</i></b>	1, 2	$<10$	NA	$\geq 10$	NA
	3	$\leq 10$	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<b><i>Listeria spp.</i></b>	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
<b><i>Staphylococcus coagulase positiva</i></b>	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	1, 2 e 3	$<10$	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<b><i>Salmonella spp.</i></b>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g

As análises microbiológicas a géneros alimentícios no laboratório *YourLAB Segurança Alimentar* têm de ser obrigatoriamente efetuadas sempre seguindo o Decreto-lei nacional, que reverte para outras normas Europeias e Internacionais, respeitando todas as boas práticas laboratoriais assim como os critérios microbiológicos estabelecidos, de forma a obter resultados coerentes e aceites nacional e internacionalmente.

### 2.5.2. Legislação aplicada ao espaço e práticas laboratoriais

Os laboratórios intervenientes nas análises de avaliação de risco microbiológico de alimentos e avaliação de higienização, também devem seguir normas específicas para que sejam efetuados os melhores e mais credíveis ensaios laboratoriais, assim como uniformizar o espaço e práticas laboratoriais a nível internacional. O espaço laboratorial diz respeito, principalmente, ao espaço físico em que o laboratório se encontra, a forma de

gerir requisitos técnicos e validar e calibrar os métodos de ensaios, no laboratório. A norma mais geral referente a requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração é a norma NP EN ISO 17025:2005 intitulada de “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”. A aceitação dos resultados de ensaios e calibrações entre países deverá ser facilitada se os laboratórios satisfizerem esta norma e se obtiverem a acreditação por parte de organismos que tiverem estabelecido acordos de reconhecimento mútuo com outros organismos de outros países que também a utilizem (46).

Contudo, como este documento não é específico para a área de microbiologia, pois abrange todos os laboratórios de várias áreas científicas, foi elaborado um documento guia “Acreditação de laboratórios de ensaios microbiológicos”, sendo apenas um apoio interpretativo da norma NP EN ISO 17025:2005, e tem a finalidade de complementar norma NP EN ISO 17025:2005 no que diz respeito a requisitos técnicos microbiológicos específicos e auxiliar tanto laboratórios microbiológicos, como auditores e responsáveis pelo Organismo Nacional de Acreditação. Este guia é da autoria da Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE) (47). Para além deste documento existe a norma internacional ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations”, que também abrange todas as práticas laboratoriais e tem a mesma finalidade do guia elaborado pela RELACRE.

De acordo com esta norma, é muito importante o laboratório estar estruturado de modo a minimizar os riscos de contaminação cruzada, devendo a área do laboratório estar definida e estruturada de acordo com os princípios que ajudam a minimizar riscos de contaminação, como a circulação dentro do laboratório sempre no sentido de “sala limpa” para “sala suja”, realizar os vários procedimentos de forma sequencial e de modo a garantir as condições de ensaio e integridade da amostra; e gerir as atividades em termos de espaço e/ou tempo. Deve-se ter cuidado com a área de lavagem para que não haja transferências de vestígios de substâncias que possam afetar o crescimento microbiano. Para além destes, existem outros requisitos relativamente ao espaço, como as salas deverem ser todas ventiladas de forma adequada, e o tipo de material que é utilizado no espaço laboratorial como as paredes e o chão, assim como a mobilação. Ainda estão dispostos outros requisitos relacionados com o pessoal técnico responsável pelos ensaios, a validação dos métodos dos mesmos, o cálculo de incerteza de medição, os equipamentos (manutenção, calibração e verificação de funcionamento), os reagentes e meios de cultura, materiais e culturas de referência, amostragem, manuseamento e identificação das amostras, remoção do lixo contaminado, garantia da qualidade dos resultados, e por último os relatórios de ensaios (47, 48).

## 2.6. Contaminação de carne picada pela bactéria *Escherichia coli*

### 2.6.1. Caracterização da bactéria *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* foi descoberta em 1885, por Theodor Escherich, um pediatra alemão, nas fezes de uma criança com diarreia (49). Bactérias desta espécie, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são gram-negativas, tendo as suas células (não esporuladas) uma forma rodada. Para além disso, sabe-se que as bactérias *E. coli* são organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, capazes de fermentar glucose e lactose convertendo estes substratos a numerosos metabolitos orgânicos necessários para formar os seus lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, e outros constituintes orgânicos celulares, com produção de ácido e gás (50). Dentro da família *Enterobacteriaceae*, apenas as bactérias *E. coli*, juntamente com bactérias *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* demonstraram uma associação positiva com a enzima  $\beta$ -glucuronidase, o que as distingue de todas as outras espécies, sendo que cerca de 98% das estirpes de *E. coli* são capazes de produzir esta enzima. A enzima  $\beta$ -glucuronidase é uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos  $\beta$ -glucopiranosiduronicos nos seus aglicons correspondentes e ácido glucurónico; reação que é utilizada para detetar a atividade desta enzima, e consequentemente detetar *E. coli*, em meios de cultura com substratos específicos (51, 52).

Até 1940 todas as estirpes de *E. coli* eram consideradas não patogénicas, até que nessa data foram encontradas estirpes patogénicas associadas a graves surtos de diarreia em crianças. Enquanto muitas estirpes desta bactéria têm uma presença natural na microflora dos intestinos do trato intestinal de animais e humanos, outras contudo, são patogénicas causando uma variedade de doenças, intestinais ou não, que podem variar desde um caso pontual e uma situação de ameaça de vida (53).

De um modo geral, os fatores de virulência das estirpes patogénicas de *E. coli* incluem a produção de toxinas, também chamadas de *Shiga* toxinas, a capacidade desta bactéria aderir intimamente à mucosa intestinal por um mecanismo de agregação mediado parcialmente pelo gene *eae* e a produção de hemolisina mediada pelo gene *hly*. A hemolisina é uma proteína causadora de infeções extra-intestinais (como cistites, nefrites, meningite e septicemia, em humanos e animais) e intestinais (enterites e enterotaxemia) (53). Como aspeto característico de bactérias gram-negativas, a bactéria *E. coli* apresenta polissacarídeos como componente principal da sua membrana extracelular. O lipossacarídeo tipicamente contém três partes estruturais: o lípido A (endotoxina), um oligossacarídeo central (único), e o antígeno O (polissacarídeo distal). O antígeno O consiste numa repetição de unidades de oligossacarídeos, sendo o maior contribuinte para a variabilidade antigénica na superfície da membrana, pois é um dos constituintes celulares mais variáveis entre bactérias, devido à presença de diferentes oligossacarídeos e diferentes ligações entre eles (54). Na figura 4 é demonstrada a presença estrutural do antígeno O na membrana externa de *E. coli*. Para além do antígeno O, as bactérias gram-negativas também possuem um antígeno H. Os antígenos H são referentes aos flagelos da *E. coli* e

são definidos como estruturas finas e tubulares, que constituem as subunidades da proteína flagelina. As especificidades dos antígenos H são determinadas pelo método de aglutinação das células bacterianas flageladas. Para além destes, também existe o grupo de antígenos K relacionados com os polissacarídeos capsulares, que indicam a presença de antígenos envolventes e antígenos capsulares, que por sua vez englobam antígenos termoestáveis ou termolábeis (55).

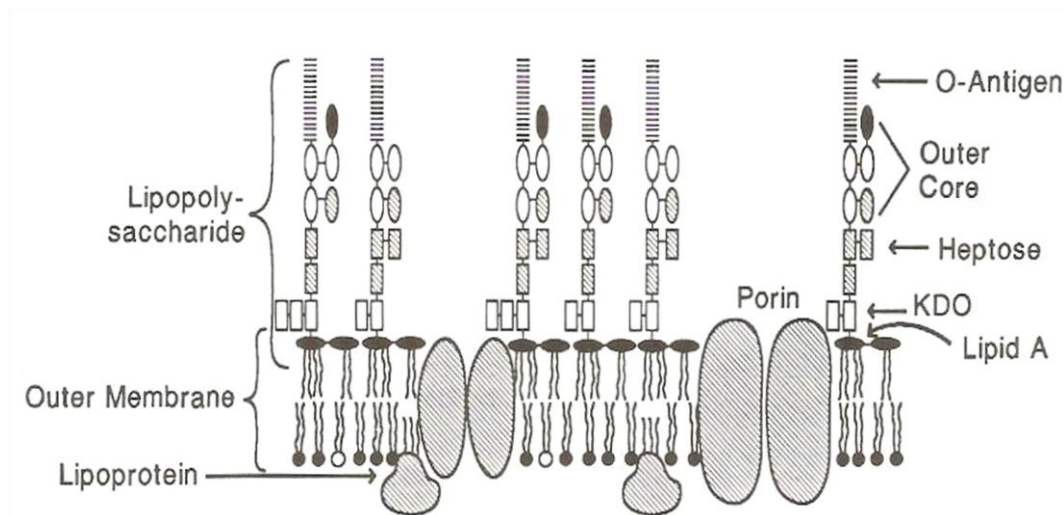


Figura 4 – Diagrama representativo da membrana exterior de *E. coli*, demonstrando a posição do antígeno O. Os retângulos e formas ovais representam resíduos de açúcares e os círculos indicam os grupos polares dos glicerofosfolípidos. KDO representa ácido 3-desoxi-D-mano-octulônico. Adaptado da referência 55.

As características do antígeno O são utilizadas para definir os diferentes serogrupos de *E. coli* existentes que, juntamente com as características dos antígenos H e K distinguem os diferentes serotipos desta mesma bactéria. É de salientar a distinção entre serotipos e estirpes bacterianas, visto que o serotipo é a caracterização serológica da bactéria e várias estirpes podem possuir as mesmas características serológicas. Para além disso, as estirpes distinguem-se entre a espécie segundo a diversidade genómica demonstrada pela hibridização de DNA (56). Mais de 700 serotipos de *E. coli* foram identificados mas, apesar disso, é importante ter em conta que a maioria não causa doenças em humanos; aliás, algumas são benéficas (57).

Na tabela 6, encontra-se uma descrição dos vários tipos patogénicos de *Escherichia coli* e vários serotipos respetivos, consoante o diferente grau de virulência. Entre estes grupos patogénicos de *E. coli* descritos na tabela 6, o grupo de bactérias EHEC (*Escherichia coli* Enterohemorrágica) é o mais comentado e estudado, pois é o grupo mais emergente, causador de uma variedade de doenças gastrointestinais que se podem agravar a colite hemorrágica ou a síndrome urémica hemolítica e a falha renal aguda em crianças (58).



Tabela 6 – Diferentes estirpes patogênicas de *E. coli*, doenças e sintomas associados, e respectivos serotipos. Adaptado de referência 58.

		Virulência	Doenças	Sintomas	Exemplos de Serotipos
<i>Escherichia coli</i> Enterica/diarreica	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogenica (EPEC)	Lesões típicas de agregação no Ílio	Infeção Intestinal	Diarreia, vômitos, febre baixa	O26, O44, O55, O86, O111, O114, O125, O127, 142, O158
	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigenica (ETEC)	Toxinas termolábeis e/ou termoestáveis	Diarreia infecciosa	Diarreia ligeira a severa	O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 e O173
	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	Invasão e multiplicação nos enterócitos	Desintéria	Pequeno volume de fezes com sangue e muco	O29, O124, O136, O143, O144, 152, O164, O167
	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	Produção de <i>shiga</i> toxina	Colite hemorrágica, Síndrome hemorrágica urêmica	Diarreia e dores abdominais, falência renal	O26, O48, O55, O91, O98, O104, O117, 118, O126, O128, 145, O157, O178, 181
	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	Colonização à mucosa intestinal; secreção de enterotoxinas e citotoxinas	Toxicoinfecção	Diarreia	O3, O7, O15, O44, O77, O86, O111, O126, O127
	<i>Escherichia coli</i> Aderente difusiva (DAEC)	Adesão difusa às células	Diarreia, infecções do trato urinário, septicemia	Diarreia aquosa (sem sangue e leucócitos nas fezes)	-
Infecções trato urinário	<i>Escherichia coli</i> Uropatogénica (UPEC)	Cromossomas com ilhas de patogenicidade e/ou aderência celular difusa	Cistite simples e pielonefrite aguda		-

Na tabela 7, resume-se o registo de alguns alimentos contaminados com vários serotipos respetivos a *E. coli* do tipo EHEC. A maioria dos registos relativos a contaminação por EHEC resume-se a alimentos como carne, leite e respetivos produtos derivados, contudo, em Maio de 2011 surgiu um novo serotipo desta bactéria, a *E. coli*

O104:H4 que causou um grande surto alimentar no norte da Alemanha, tendo tido como veículo de transmissão sementes de couve frescas (59).

Tabela 7 – Registo de alimentos contaminados com diversos serotipos de *E. coli*.

Alimentos	Serotipo <i>E. coli</i>	Referência
<b>Queijo soft</b>	08, 018, 0128	(60)
<b>Requeijão</b>	044, 079	(60)
<b>Leite de vaca não pasteurizado</b>	026	(61)
<b>Leite de ovelha</b>	O157, O111, O26	(62)
<b>Carne picada</b>	O1, O15, O26, O56, O26, O111, O146, O156, O157	(63, 64)
<b>Salsichas</b>	O62, O3, O22, O26, O149, O76, O157, O121	(63)
<b>Alface e outros vegetais frescos</b>	O104, O145	(59, 65)

### 2.6.2. Serotipos patogénicos de *Escherichia coli* em carne fresca

Como foi referido anteriormente, a bactéria *Escherichia coli* é originária do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, sendo o gado o maior reservatório de bactérias *E. coli* patogénicas. Vários estudos identificaram diferentes serotipos de *E. coli* em animais ruminantes domésticos, nomeadamente o serotipo O128 em ovelhas (66); os serotipos O5, O7, O13, O22, O26, O33, O55, O111, O113, O116, O128, O136, O138, O145, O150, O157, O168, O174 em gado bovino (67); O87, O43, O5, O174, O146; O113 e O17 em cabras leiteiras (68); O157 em galinhas, perus e porcos (69).

O serotipo de *E. coli* identificado como mais comum e mais patogénico mundialmente é o O157:H7 e foi a primeira vez identificada como patogénico humano durante dois surtos em Michigan e Oregon que envolveu um hambúrguer mal passado, em 1983 (70). Foi avaliada, na Coreia, a presença deste serotipo O157:H7 em carne obtida de gado bovino, suíno e de galinhas, ao longo de 2 anos e 3 meses, e verificaram um total de 94, 80 e 52 serotipos *E. coli* O157:H7 isolados de um conjunto de 864 vacas, 345 porcos e 418 galinhas, respetivamente (69). Um outro estudo em Itália conduziu testes para avaliação da presença de *E. coli* O157:H7 em amostras de carne picada (algumas juntamente com vegetais) obtidas dos retalhistas e identificou esta bactéria em 28% das amostras de carne picada de bovino, 30,0% de mistura de carne picada de bovino com galinha, 20% em hambúrguer, 54,4 % em hambúrguer com vegetais e 20,0% em almondegas (71). No entanto, para além deste serotipo existem registos de outros serotipos de *E. coli* isolados de carne, nomeadamente um estudo que descreve o isolamento de diversos serotipos como O7:H10, O22:H16, O111:H–, O119:H– e O174:H21, O26:H11, O123:H11 e O177:H11, em bezerros, não tendo sido registado nenhum serotipo de *E. coli* O157:H7 (67). Estes estudos demonstram a elevada suscetibilidade de contaminação da carne por diferentes serotipos de *Escherichia coli*.

No caso de uma infecção fatal pela *E. coli* O157, é estimado um gasto de cerca de \$7 milhões. Contudo, por vezes é difícil evitar um surto alimentar, visto que o tempo necessário desde a ocorrência de uma contaminação até ao momento de deteção da mesma e sua reportação varia entre 6 a 23 dias, no caso da patogénica *E. coli* O157, representada na figura 5, publicada online pela agência *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (72).

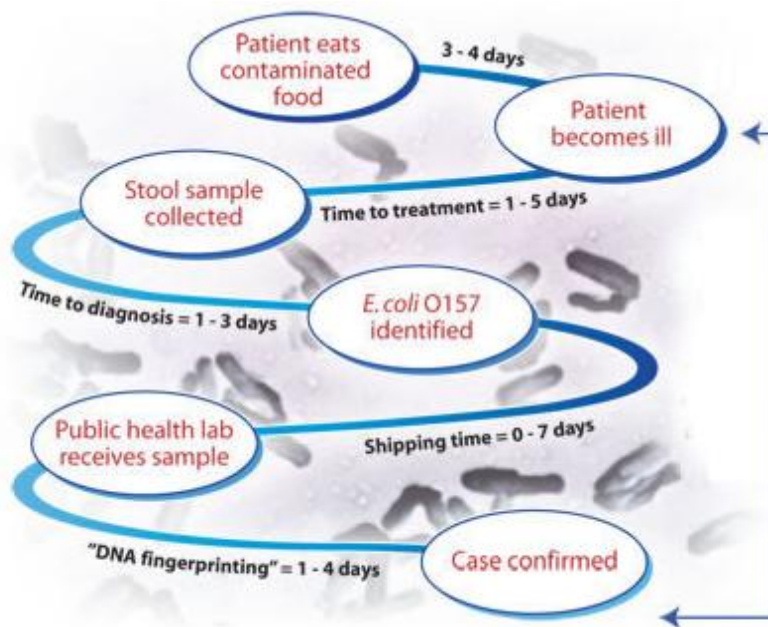


Figura 5 - Tempo estimado de reportação de um caso de infecção por *E. coli* O157 (72).

De acordo com a figura 5, publicada pela CDC, a partir do momento em que um paciente ingere um alimento contaminado, a manifestação da doença pode demorar entre 3 a 4 dias, e são necessários mais cerca de 1 a 5 dias para recolher uma amostra para análise. A bactéria, neste caso a *E. coli* O157, apenas é identificada após 1 a 3 dias e esse resultado poderá ser reportado imediatamente ou no prazo de aproximadamente 7 dias, e ainda será necessária uma confirmação da contaminação pelo laboratório público de saúde, o que poderá ainda levar 1 a 4 dias (figura 5).

### 2.6.3. Aspetos da contaminação por *Escherichia coli* em carne picada fresca

#### *Origem de contaminação*

O abate, incluindo a evisceração dos animais, representa um dos processos mais propícios a originar contaminação da carne visto que existe elevada possibilidade de infecção da superfície das carcaças a partir de bactérias existentes na pele, nos pelos e cascos dos animais, assim como através dos microrganismos existentes no trato gastrointestinal. Como consequência da contaminação das carcaças, existe potencial para as populações de *E. coli* serem distribuídas na superfície dos equipamentos associados ao processo de abate, processamento das carnes e assim potencialmente (re)contaminar carcaças e produtos de carne fresca (73). A presença de *E. coli* em superfícies e

equipamentos em áreas de fabricação de carne, está bem documentada e tem sido associada com a capacidade do patogénico, agarrar, colonizar e formar biofilmes nestas superfícies (74).

Para além da fase de abate e processamento das carcaças, a contaminação de carne com *E. coli* pode ocorrer durante a distribuição e armazenamento, principalmente devido à ausência de um controlo nos valores de temperatura. O manuseamento impróprio de carne não embalada, e/ou o contacto desta com outras já embaladas também pode levar a contaminação cruzada. Evidências epidemiológicas em casos de surtos de *E. coli* em carne de vaca continuam a ser associados com consumidores/setores de serviços que não entendem os riscos de manuseamento inadequado da carne crua ou mal cozinhada e com práticas de higiene inadequadas (75).

### ***Suscetibilidade do alimento***

A carne fresca é reconhecida como um dos alimentos mais perecíveis aos microrganismos, pois possui uma composição química favorável ao crescimento microbiano a níveis inaceitáveis contribuindo significativamente para a deterioração da carne e contaminação. A multiplicação de patogénicos nos produtos cárneos pode ocorrer em qualquer etapa da produção e do consumo e depende de fatores intrínsecos como  $a_w$ , pH, composição química, fatores antimicrobianos naturais, interações entre os microrganismos e de fatores extrínsecos relacionados com o ambiente como por exemplo a temperatura (76). Entre estes fatores, os que mais influenciam o crescimento microbiano em carnes frescas são a temperatura,  $a_w$  e o pH, principalmente alterado de acordo com o teor de ácido láctico. A carne fresca possui um elevado teor de água disponível ( $a_w$  de 0,98) pois apresenta uma constituição em água de cerca de 72-74%, um pH próximo do neutro (5,5-6,5) e fontes de energia (20-22% de proteínas e 3-5% de gorduras) assim como nutrientes disponíveis, o que torna este alimento ideal para o crescimento de muitos microrganismos (77). A *Escherichia coli* é um dos microrganismos com mais incidência em carne fresca pois, relativamente às suas condições ótimas de crescimento, a *E. coli* é capaz de crescer a valores de  $a_w$  mínimos de 0,9508; temperaturas entre 4,14°C e 49,55°C e a um  $\text{pH} \geq 3,91$  (78). Demonstrando, num outro estudo, uma taxa de crescimento máxima a 28°C, num meio com um pH de 5,5 e  $a_w$  0,987 (79).

No entanto, a carne fresca quando picada é ainda mais suscetível a contaminação, do que outras peças de carne fresca, pois enquanto a contaminação de peças intactas (como por exemplo bifes) é geralmente limitada à superfície deste produto, o processamento de carne picada provoca um espalhamento dos microrganismos para o interior do volume de carne. Para além disso, o processo de moagem faz com se libertem fluidos da carne, que por sua vez são um excelente meio para o crescimento microbiano. Sendo assim, a carne picada é considerada um alimento com potencial risco para sofrer contaminação (80).

Relativamente à temperatura, um estudo acerca da incidência de *E. coli* patogénica em carne picada não verificou nenhum crescimento significativo desta bactéria a 7,2°C em

carne picada armazenada durante 72h. No entanto, a concentração da bactéria aumentou 1,0 log ufc/g a 10°C (após 48h), e à temperatura ambiente (22°C) demonstrou um aumento significativo de crescimento após 6h (81). Este estudo pode ser complementado com um outro que averiguou o tempo demorado pela *E. coli* a atingir o crescimento máximo, em carne de peru, comparando temperaturas de 15, 25, 35 e 40°C, em que se verificou um crescimento mais rápido a temperaturas de 40°C (82).

A flora competitiva também é um fator com influência no crescimento da *E. coli* no ambiente alimentar. Um estudo que avaliou o crescimento da *Escherichia coli* (mais precisamente a *E. coli* O157:H7) em oito carnes picadas diferentes adquiridas comercialmente, na presença de uma microflora de fundo (maioria *Lactobacillus sakei*), sob condições aeróbicas e anaeróbicas, a 12°C (temperatura escolhida para simular uma situação de condições de mau armazenamento em estabelecimentos comerciais), demonstrou que elevados níveis de microflora de fundo inibiram o crescimento de *E. coli* tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas, embora mais pronunciado nas condições anaeróbicas (83). Contudo, as medidas aplicadas para redução de patogénicos não são seletivas para os patogénicos, e assim sendo, a microflora de fundo inofensiva também é reduzida. Apesar de a microflora interferente poder ser importante no controlo do crescimento de organismos de origem alimentar como a *E. coli*, deve ser notado que sob nenhuma circunstância se observou morte de *E. coli*, devido à presença desta microflora. Devido à baixa dose infecciosa deste patogénico, mesmo a sobrevivência sem o crescimento significativo em carne picada pode representar um risco de problema de saúde pública. Deste modo, independentemente do nível de microflora interferente são absolutamente necessárias medidas para reduzir a contaminação da carne pela bactéria *E. coli* (84).

Outros estudos verificaram uma associação da prevalência e contaminação de *E. coli* em carne com a resistência a antibióticos. O aparecimento de bactérias com esta resistência originou-se pelo crescente uso de antibióticos, para controlar infeções bacterianas, ao longo dos anos e, deste modo, permitiu espécies mais resistentes desenvolverem-se e proliferarem (85). Num estudo realizado em Espanha verificou-se a existência de *E. coli* com diferentes resistências a antibióticos, isolada de vários alimentos como: hambúrguer, salsichas e carne picada de galinha, pele de galinha, produtos pré-cozinhados de galinha, produtos de peru, entre outros. Deste conjunto de 69 amostras de alimentos, foram isoladas bactérias *E. coli* de 49 destas amostras e uma percentagem significativa destas bactérias, apresentou resistência a 12 dos 16 antibióticos testados, sendo de notar especialmente uma resistência de 53% das bactérias *E. coli* ao antibiótico *Nalidixic acid* (86). Alguns estudos sugerem que a resistência a antibióticos pode estar associada a diferentes cinéticas de crescimento por parte das bactérias, e resistência a diferentes condições de stress. Por exemplo, foi verificado que certos serotipos de *E. coli* como a *E. coli* O157:H7 têm uma alta tolerância a acidez e têm sido associados a surtos em alimentos com baixo pH como sumos e produtos lácteos, e foi sugerido que a sobrevivência da *E. coli* O157:H7 a baixo pH apresenta uma ligação possível entre a aquisição da resistência a antibióticos e que esta resistência também pode estar ligada a uma tolerância a temperaturas elevadas (87).

#### **2.6.4. Legislação específica aplicada à enumeração de *Escherichia coli* em carne picada**

A análise da qualidade microbiológica, e frequência de amostragem, de carne picada fresca comercializada nos estabelecimentos do nosso país, está descrita na legislação portuguesa, na Portaria n.º 699:2008 – “Ministérios da economia e da inovação e da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas”, publicada no *Diário da República*, 1.ª série — N.º 145 — 29 de Julho de 2008 (88). A frequência de amostragem para análise bacteriológica em pequenos matadouros e em estabelecimentos de produção de carne picada, está estabelecida no artigo 8º da Portaria n.º 699:2008 que indica que estes estabelecimentos podem realizar a amostragem com uma frequência mensal, se os resultados das 6 ou 10 semanas (conforme quantidade de produção) imediatamente prévias à data forem satisfatórios na pesquisa de *E. coli* (indicadora de contaminação fecal) e no número de colónias aeróbias. Para além disso, o artigo 8º da Portaria 699:2008 reverte para o artigo 4º da norma CE n.º 2073:2005 (relativa a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios) que abrange “testes baseados em critérios”, descrevendo que os operadores das empresas do sector alimentar devem efetuar os testes com base nos critérios microbiológicos estabelecidos na respetiva norma (89, 90). Na categoria de carne picada, o plano de amostragem compreende a recolha de 5 amostras de carne e a análise destas apenas pode apresentar 2 unidades de amostras de carne com valores de UFC/g entre os valores limite de  $5,0 \times 10^1$  UFC/g e  $5,0 \times 10^2$  UFC/g. Se mais do que duas unidades de amostra contiverem valores entre os valores limite ou alguma unidade de amostras, entre as 5, apresentar um valor acima do limite superior, a carne picada não está apta para consumo, apresentando uma não-conformidade à legislação. O método de análise proposto é o método descrito segundo a norma internacional ISO 16649-2:2001 “Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-  $\beta$ -D-glucuronide”. Esta análise aplica-se no final do processo de fabrico. Caso a amostra apresente resultados insatisfatórios deve ser melhorada a higiene na produção e de seleção e/ou origem das matérias-primas (90).

A legislação estabelecida para a carne picada é específica, diferindo de outros tipos de carne (com a exceção de “carne separada mecanicamente”) ou mesmo carcaças de animais, tendo sido estabelecidos limites mais restritos de valores unidades formadoras de colónias (UFC) de *E. coli* por grama de carne. A razão que fundamenta estes critérios é o facto do processo de moagem da carne ser propício a um espalhamento dos microrganismos por toda a carne e a libertação de fluidos resultantes do processamento ser favorável ao crescimento microbiano, tal como foi dito no ponto anterior relativo a “aspetos da contaminação por *Escherichia coli* em carne picada fresca” (89).

### 2.6.5. Método de enumeração de *Escherichia coli* $\beta$ -glucuronidase positiva e comparação com outros métodos

Existem diversos e variados métodos possíveis para a detecção de bactérias patogênicas, como a *E. coli*, em alimentos, sendo que estes podem ser agrupados em diferentes categorias segundo o seu princípio e base de especificidade. Desta forma, podem distinguir-se métodos de cultura em placa (métodos tradicionais e meios modificados), métodos bioquímicos (como Bioluminescência de ATP), métodos microscópicos (como Citometria de Fluxo), métodos imunológicos (como *Enzyme-Linked Immuno Assay*) e métodos moleculares (como a *Polymerase Chain Reaction*, entre outros).

#### *Citometria de fluxo*

A Citometria de Fluxo consiste num método microscópico baseado na visualização das características das células quando estas são expostas a um feixe de luz laser. À medida que as bactérias, suspensas numa solução, passam sob o feixe de luz laser, esta luz é tanto dispersa como absorvida pelas bactérias, sendo detetada a direção e extensão da dispersão, e a fluorescência, através de um sistema de lentes e fotocélulas, como se pode ver na figura 6 (91). A refração da luz está relacionada com o tamanho e estrutura interna da bactéria, enquanto a fluorescência é emitida pelos componentes celulares como os nucleótidos de flavina, piridina e pigmentos fotossintéticos. Esta técnica é altamente sensível visto que cerca de  $10^2$ - $10^3$  bactérias por mililitro podem ser detetadas, sendo os resultados obtidos em poucos minutos. Uma desvantagem no uso de microbiologia alimentar é que método não distingue células viáveis de células mortas, e pode ocorrer interferência com a matriz do alimento (92).

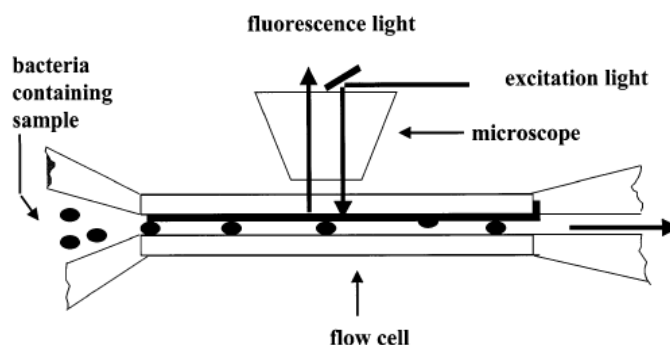


Figura 6 – Citometria de fluxo: deteção automática de células individuais usando marcadores óticos fluorescentes (91).

#### *Bioluminescência de ATP*

Relativamente à Bioluminescência de ATP, esta técnica baseia-se na medição de emissões de luz produzidas devido à presença de ATP bacteriano, processo este que é desencadeado por uma reação de enzima-substrato entre luciferina e luciferase, conforme

se vê no esquema da figura 7. A quantidade de luz produzida (medida em Unidades Relativas de Luz (RLUs)) é proporcional à concentração de ATP e desta forma, é detetado o número de bactérias presentes na amostra. Apesar deste método ser extremamente específico pois são apenas detetadas células viáveis, apresenta a desvantagem de baixa sensibilidade visto que apenas deteta a presença de bactérias quando presentes em grande número ( $>10^3$  UFC/g) (93).

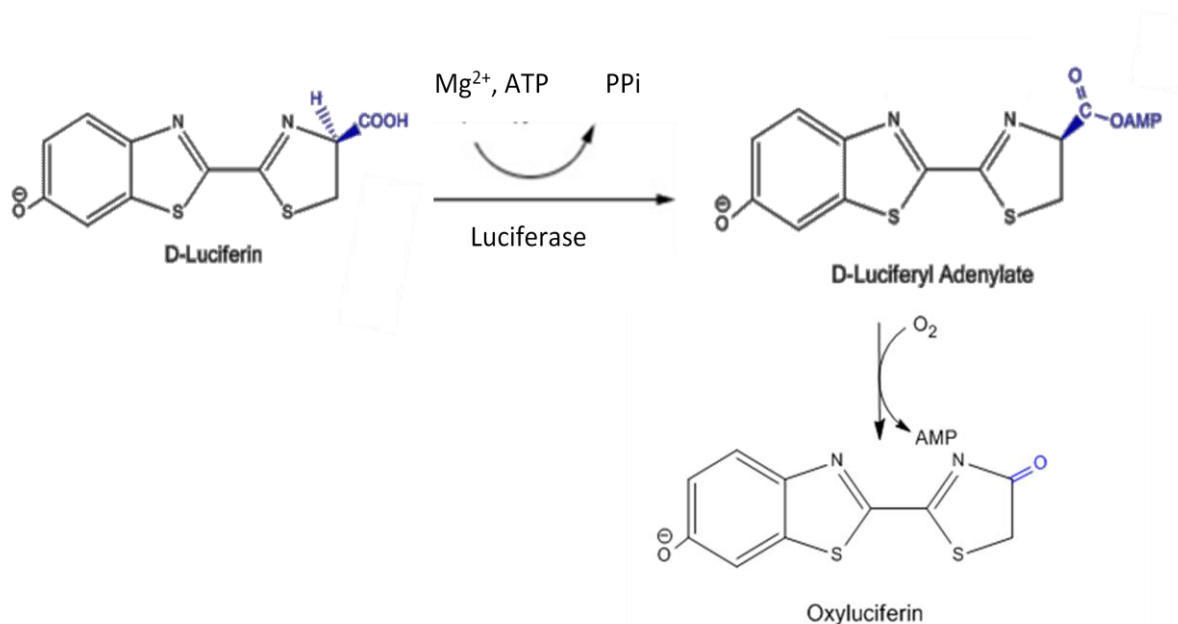


Figura 7 – Reação de Luciferina, na presença de ATP e oxigénio. Adaptado de referência 93.

### ***Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)***

Dentro dos ensaios imunológicos, a técnica de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) é uma das mais conhecidas, sendo esta técnica normalmente adquirida comercialmente na forma de ELISA “sandwich”. Neste método, anticorpos específicos são fixos a uma superfície de 96 poços (numa placa de microtitulação) que são utilizados para capturar o antígeno (da bactéria ou toxina) presente no alimento. Posteriormente é adicionado a cada poço, um segundo anticorpo conjugado com uma enzima, como por exemplo a fosfatase alcalina, sendo ainda adicionado um substrato enzimático de seguida, que permite a identificar deste complexo. Os resultados podem ser reportados visualmente ou com um espectrofotómetro. A sensibilidade de deteção da técnica ELISA é cerca de  $10^5$  UFC/ml. Hoje em dia existe este sistema automatizado, e os resultados já são reportados pelo equipamento (92, 94).

### ***Fluorescent in situ hybridization (FISH)***

Entre as técnicas moleculares, a Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) é a técnica mais utilizada, com a exceção do PCR. O método FISH combina a precisão da genética molecular com a informação visual da microscopia, permitindo uma visualização e



identificação de células individuais nos seus habitats naturais. Desta forma, as sequências de ácidos nucleicos podem ser examinadas dentro das células, sem alterar a morfologia celular ou a integridade dos vários compartimentos. As células microbianas são primeiramente tratadas com químicos fixativos apropriados e depois são hibridizados sob condições específicas numa superfície de vidro ou uma solução de sondas de oligonucleótidos. Normalmente as sondas têm um comprimento de 15-25 nucleótidos e são marcadas covalentemente na extremidade 5' com um corante fluorescente. Após uma lavagem rigorosa, as células coradas são detetadas via microscopia epifluorescente ou por citometria de fluxo, como demonstrado na figura 8 (95). O limite de detecção é cerca de  $10^3$  células/ml.

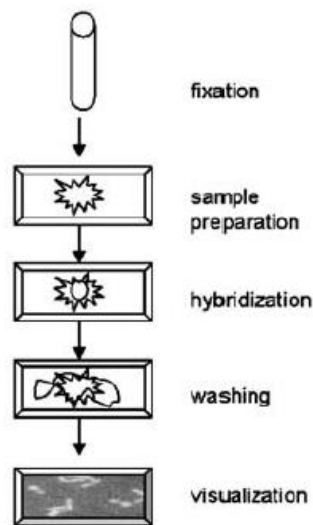


Figura 8 - Fluxograma típico de um ensaio de FISH (95).

### ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Entre todos os métodos, o mais descritos em estudos de avaliação da presença de *E. coli* em carne e carne picada, é o *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Este método molecular consiste em três passos principais: 1) desnaturação do DNA da amostra em estudo (bactéria, gene de virulência ou toxina) de cadeia dupla, em cadeias simples; 2) ligação de pequenos fragmentos específicos de DNA (*primers*) a cada cadeia; 3) extensão de ligação de *primers* complementares à cadeia de DNA através da ação de uma enzima DNA polimerase termoestável, *Thermus aquaticus* (*taq*). Depois de o DNA do gene alvo ser amplificado (a amplificação requer cerca de 20 a 40 ciclos), os produtos de amplificação são analisados, normalmente por electroforese em gel de agarose, detetados após coloração dos produtos de amplificação através de um fluorocromo ou hibridação com uma sonda marcada (96).

Este método apresenta várias desvantagens como a sensibilidade da enzima polimerase a contaminantes ambientais, dificuldades na quantificação, e a possibilidade de obtenção de resultados falsos positivos através da detecção de ácidos nucleicos de

microrganismos não viáveis. A realização de um passo de enriquecimento da amostra prévio ao ensaio de PCR pode auxiliar a ultrapassar algumas dessas desvantagens, pois desta forma a quantidade de DNA alvo é aumentada, e diminuída a quantidade de inibidores de PCR que estejam presentes na amostra (97). Relativamente ao problema de quantificação este pode ser ultrapassado utilizando a *Polimerase Chain Reaction* num modo que explora outras propriedades da *taq* polimerase (como PCR em tempo real). Esta polimerase de DNA, para além da atividade polimerase também tem atividade 5'nucleótica, que hidrolisa moléculas de ácido nucleico hibridizadas à cadeia simples. Como demonstrado na figura 9, no ensaio de nuclease 5' aplica-se uma sonda fluorogénica duplamente marcada com um fluorocromo *reporter* na extremidade 5' e um segundo *fluorocromo* que tem a capacidade inibir a emissão do corante *reporter*, designado de *quencher*. A inibição da emissão de fluorescência depende da distância que permanece entre ambos os *fluorophores* estando estes covalentemente ligados aos oligonucleotídeos. Quando a DNA polimerase hidrolisa a sonda fluorogénica, o fluorocromo *reporter* é libertado e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência aumenta. Este aumento é proporcional à quantidade de fluorocromo libertado, que por sua vez é proporcional ao número de moléculas modelo presentes na reação (98).

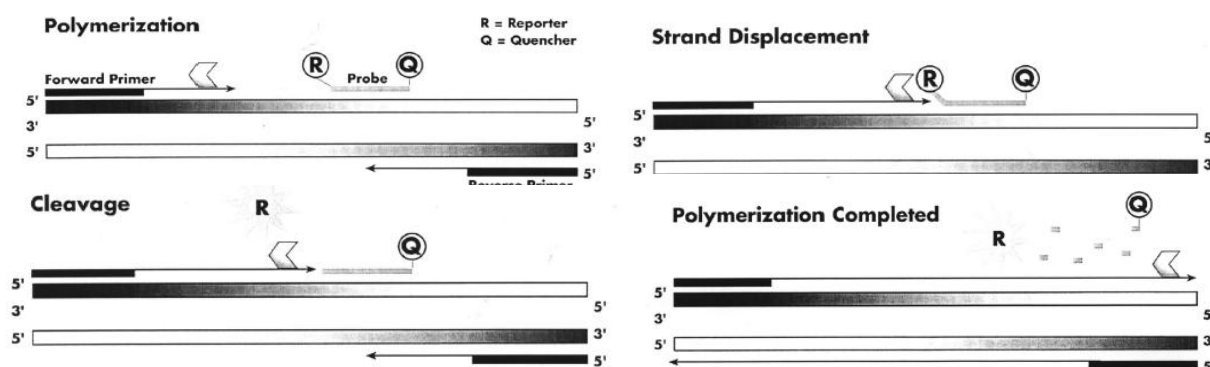


Figura 9 – Reação de *Polymerase Chain Reaction*, utilizando um fluorocromo *reporter* e um fluorocromo *quencher* (98).

Vários procedimentos de PCR (incluindo em modo “Tempo real” e “Multiplex”) foram desenvolvidos para detetar, em carne, diferentes combinações dos genes de virulência de *E. coli*, incluindo a pesquisa de genes de virulência de interligados com resistência a certos antibióticos (99), e/ou diferentes serotipos de *E. coli* (100), ou mesmo detetar a presença de *E. coli* simultaneamente com outras bactérias patogénicas (101).

### Microarrays

Para além do PCR, um outro método molecular que tem sido cada vez mais desenvolvido nos últimos anos é o método de *Microarrays*. Os *Microarrays* constituem um sistema miniaturizado para a análise simultânea de hibridização de cadeias únicas de nucleótidos fluorescentes com um arranjo de sondas de oligonucleotídeos imobilizados num suporte como uma membrana sintética ou de vidro. Os *Microarrays* são utilizados no

diagnóstico de alimentos, como uma ferramenta para identificação, genotipagem e tipagem patogénica (detecção de fatores de virulência) ou caracterização de bactérias isoladas (102). A aplicação mais comum dos *Microarrays* é a análise de expressão genética diferencial, com o principal objetivo de comparar níveis de expressão dos genes selecionados sob duas condições distintas, como por exemplo condições de controlo vs condições de teste (figura 10). Como se pode visualizar na figura 10, este método exige primeiramente a extração de RNA total das amostras a analisar, seguido da obtenção do cRNA (RNA de cópia) ou cDNA (DNA de cópia), que são marcados com sondas fluorescentes (podendo cada amostra ser marcada com uma sonda distinta), e posteriormente, as amostras são colocadas em cada poço (contendo diferentes sondas de oligonucleótidos), dando-se a hibridação (103). Visto que os *arrays* de DNA permitem simultaneamente analisar milhares de interações entre as moléculas de DNA alvo e sondas derivadas do genoma, os *Microarrays* produzem rapidamente enormes quantidades de dados nunca antes encontrados. A análise dos resultados é o maior desafio e esta técnica exige uma atenção permanente na purificação do material genético para uma análise de sucesso e de confiança (102).

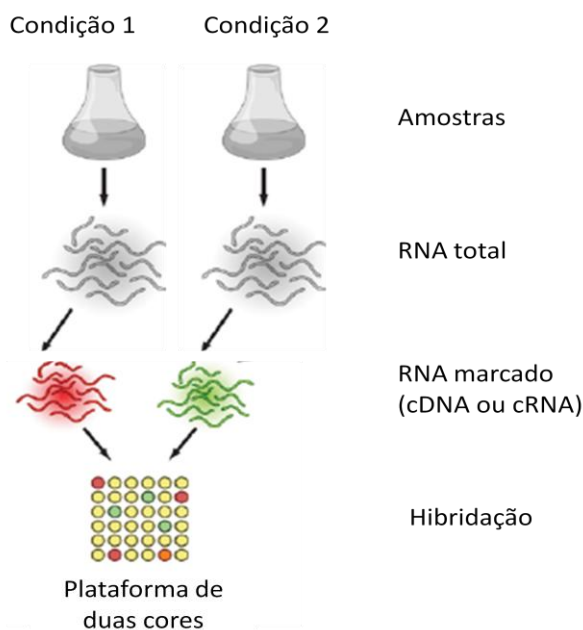


Figura 10 – Ensaio de *Microarrays*, comparando duas condições de teste. Adaptado de referência 103.

### ***Métodos de Cultura***

Apesar dos métodos de cultura em placa terem sido os primeiros métodos desenvolvidos para a detecção de patogénicos em alimentos e, embora sejam trabalhosos e demorosos, ainda são hoje em dia utilizados em muitos laboratórios, em todo o mundo. Para além de serem mais económicos que todos os métodos referidos anteriormente, apresentam elevada especificidade (104). A partir deste método tradicional foram desenvolvidos outros métodos de cultura modificados, principalmente com o intuito de reduzir a mão-de-obra necessária e a facilidade do fluxo de trabalho, reduzindo também o

tempo de análise e obtenção de resultados. Alguns destes métodos baseiam-se no método de contagem de colónias e outros usam o princípio do método do Número Mais Provável (Most Probable Number – MNP) como o TEMPO® (105) e o SimPlate® (106). Outros, compreendem essencialmente meios cromogénicos (reação de cor) ou fluorogénicos (reação fluorescente), como é o caso do meio cromogénico modificado de Triptona Bile Agar (TBX) (107) que foi utilizado para a deteção de *E. coli* em carne picada, neste estudo, que será descrita mais à frente neste mesmo capítulo.

Na tabela 8, encontram-se sumariados os diversos tipos de métodos referidos anteriormente, comparando as suas características específicas e vantagens/desvantagens da sua utilização.

Tabela 8 – Características intrínsecas de técnicas utilizadas para deteção de patogénicos em alimentos. Adaptado de referência 104.

Características	Técnicas Moleculares	Técnicas Imunológicas	Técnicas Microscópicas	Métodos convencionais
<b>Base de especificidade</b>	Sequências de DNA ou RNA	Ligação anticorpo-antigénio	Coloração com sondas fisiológicas ou taxonómicas	Testes fenotípicos (morfológicos, reações bioquímicas, etc.)
	☺	☹/☺	☺/☺	☹/☺
<b>Expressão de sensibilidade</b>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> UFC/ml	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> UFC/ml	10 <sup>4</sup> UFC/ml	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup> UFC/g
	☺	☺	☹/☺	☺
<b>Tempo obtenção resultados</b>	1-3h	10min.-1h	5-30min.	3-7dias
	☺	☺	☺	☹
<b>Diferenciação entre células viáveis/inviáveis</b>	☹/☺	☺	☹/☺	☺
<b>Interferência da matriz do alimento</b>	☹	☺	☹	☺
<b>Avaliação de vários parâmetros em simultâneo</b>	☺	☹	☹	☹
<b>Reprodutibilidade</b>	☺	☺	☺	☹
<b>Potencial para automatização</b>	☺	☺	☹	☹
<b>Intensidade de trabalho</b>	☹	☹	☹	☹
<b>Custo de materiais</b>	☹	☹	☹	☺
<b>Investimento em equipamento/infraestruturas</b>	☹	☹	☹	☺

☺ - Característica positiva/vantagem para o utilizador;

☹ - Característica tida como neutra/nenhuma vantagem ou desvantagem para o utilizador;

☹/☺ - Característica negativa/desvantagem para o utilizador.

**Enumeração de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva em carne picada**

Com o intuito de verificar a existência de *E. coli* (indicadora de contaminação fecal) em carnes picadas frescas, será utilizado neste estágio de dissertação, o método padrão descrito na norma internacional ISO 1669-2:2001 “Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidasepositive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-  $\beta$ -D-glucuronide” (90). Esta norma define um método para contagem de colônias típicas de *Escherichia coli* produtora da enzima  $\beta$ -glucuronidase, que consiste numa técnica de cultura em placa a 44°C (18-24h de incubação). O meio seletivo aqui utilizado é o TBX agar, que consiste num meio de triptona bile agar modificado contendo a substância cromogénica 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucuronide (XGLU). O XGLU no caso de sofrer ação enzimática pela enzima  $\beta$ -glucuronidase, liberta moléculas de 5-bromo-4-cloro-indoxil que, após dimerização e oxidação, forma um dímero dibromo-4-4'-dicloro-indogo que consiste num precipitado azul, como demonstrado na reação da figura 11. Desta forma, a presença de colônias azuis no meio seletivo TBX, após incubação, revela as unidades formadoras de colônias de *E. coli* existentes (107).

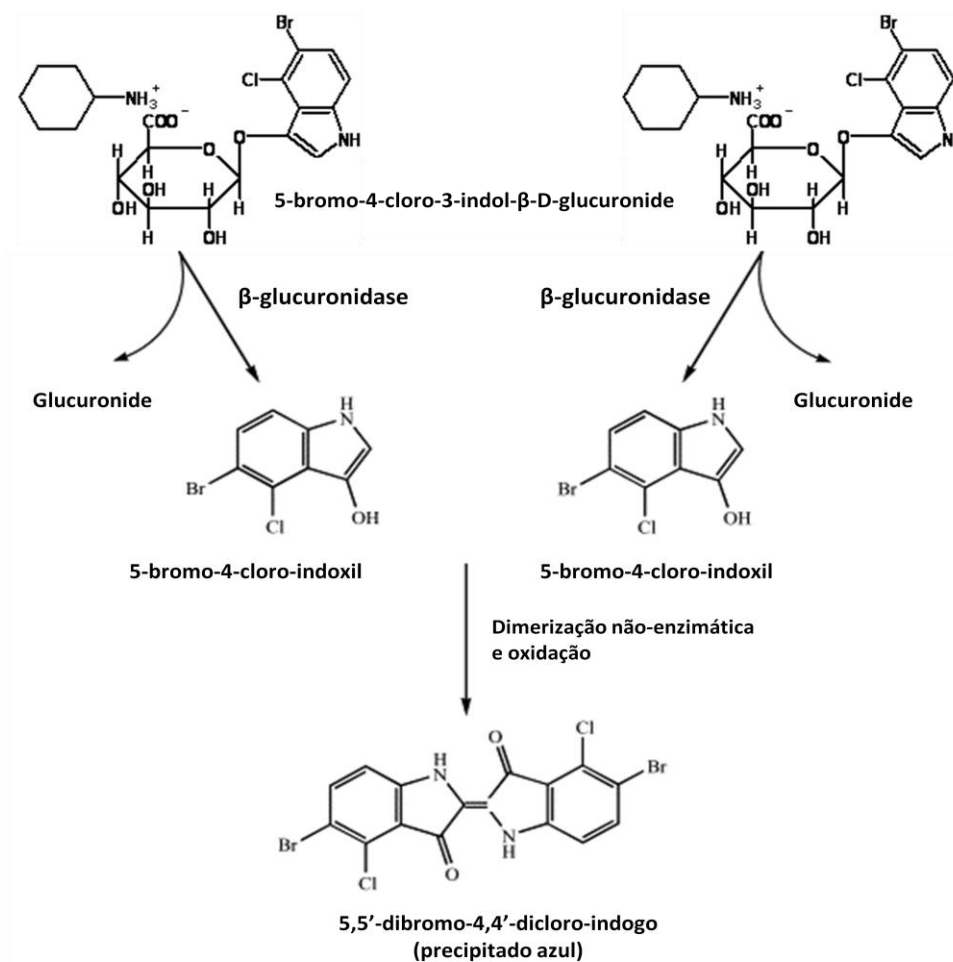


Figura 11 – Formação de 5-bromo-4-cloro-indoxil a partir da atividade de  $\beta$ -glucuronidase sobre a substância cromogénica 5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-glucuronide. Dimerização e oxidação de 5-bromo-4-cloro-indoxil, formando o dímero 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indogo. Adaptada de referência 109.

Este método é bem aceite globalmente, sendo este aspeto de grande importância no comércio internacional e na confiança de produtos exportados/importados. Uma grande desvantagem deste método é que, embora não exija nenhuma infraestrutura dispendiosa, assim como o processo de manipulação, exige uma grande quantidade de volume de meios líquidos e sólidos e englobam procedimentos demorados tanto em termos de execução como na recolha de resultados (110).

O que torna este método mais específico é que foi verificado que cerca de 98% das estirpes de *E. coli* produzem a enzima  $\beta$ -glucuronidase, tal foi indicado anteriormente na caracterização desta espécie. Para além disso, é importante referir que este método apresenta um limite de deteção de  $1,0 \times 10^1$  UFC/g. Apesar de algumas estirpes do género *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium* terem sido demonstradas produzir  $\beta$ -glucuronidase, o crescimento destes microrganismos pode ser inibido por agentes seletivos do meio e/ou nas condições de incubação (110). No entanto, as estirpes patogénicas de *E. coli* O157 não produzem  $\beta$ -glucuronidase, logo não são identificadas e quantificadas por este método e, para além disso, normalmente não crescem a 44°C. Existe um método semelhante para o isolamento do serotipo de *E. coli* O157:H7, utilizando um outro meio de cultura, como o Rainbow agar O157 ŽRB; CHROMagar O157 e O157:H7 ID agar, específico para as características deste serotipo, como o facto de não fermentar sorbitol (111, 112, 113).

### **3. Metodologias aplicadas neste estágio**

Todas as práticas laboratoriais devem satisfazer a norma NP EN ISO 17025:2005 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”, e devem seguir a norma ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations”. Para além das práticas gerais de garantia de qualidade dos ensaios efetuados, estas normas devem ser tidas em conta na prática de todos os ensaios executados, por sua vez, pela norma padrão correspondente.

Neste capítulo, são descritas todas as metodologias envolvidas no processo de recolha, receção, preparação e análise de amostras, não só respetivas a carne picada mas também a outras amostras como zaragatoas, águas e outros géneros alimentícios. Consequentemente, para além da metodologia respeitante à enumeração de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, serão descritos outros métodos de enumeração e pesquisa de microrganismos indicadores e microrganismos patogénicos. Para além disso, são referidos procedimentos de controlo de qualidade, aplicados a todo o tipo de análises e/ou tipo de amostras.

### 3.1. Colheita de amostras

O processo de colheita de amostras segue a norma NP 1828:1982 “Gêneros alimentícios. Análise microbiológica. Colheita de amostras”.

Independentemente do tipo de amostra a recolher (gênero alimentício, zaragatoa ou água), devem-se manter os cuidados de assepsia, utilizando sempre material esterilizado, de modo a manter devidamente as características microbiológicas da amostra a analisar. Para além disso, a roupa deve estar limpa e as mãos devem estar desinfetadas. O recipiente que conterá a amostra deve ser aberto o menor tempo possível, e deve ser devidamente identificado, incluindo o local e hora de recolha. As amostras devem ser transportadas em ambiente refrigerado, entre 0 e 4°C, em arcas limpas com acumuladores térmicos. Cada tipo de amostra requer cuidados específicos de recolha e transporte, descritos nas respetivas normas de referência, tal como representado na tabela 9 “Cuidados e material a ter em conta na recolha de vários tipos de amostras e respetivas normas de referência”.

Relativamente às amostras de carne picada, apenas é da responsabilidade do laboratório recebe-las com o devido cuidado, e não recolhe-las nos respetivos estabelecimentos. Como todas as lojas pertencem a uma mesma cadeia de talhos tendo em comum a empresa responsável pelo sistema de qualidade, existe um técnico responsável pela recolha de amostras nos 22 talhos. Mensalmente devem ser colhidas 5 amostras de carne picada, em cada estabelecimento, tendo em conta a Portaria 699:2008, descrita em decreto-lei português. É de importância salientar que esta recolha é previamente anunciada, não compreendendo qualquer fator surpresa por parte dos talhantes. Após a receção das amostras no laboratório, estas devem ser colocadas em refrigeração e devem ser imediatamente registadas no programa informático, sendo-lhe atribuído um código interno e um boletim de ensaio contendo a informação relativa ao parâmetro a analisar: Contagem de *E. coli* β-glucuronidade positiva. Também são recebidas 2 zaragatoas mensalmente obtidas, respetivamente, de um manipulador e de uma superfície, de cada estabelecimento. A cada uma destas amostras também lhes é atribuído um código e um boletim com os respetivos ensaios a executar: contagem de microrganismos a 30°C e contagem de enterobactérias.

Relativamente a outros estabelecimentos, a recolha de produtos e refeições, é feita por parte dos técnicos do laboratório *YourLAB S. A.* sob aviso prévio. Neste caso, é necessário a preparação dos documentos de registo da amostra de produto a recolher nos respetivos estabelecimentos, assim como um documento guia de transporte dessas amostras. Posteriormente, logo após a chegada das amostras ao laboratório, também lhes é atribuído um código interno, assim como um boletim com indicação dos parâmetros microbiológicos a analisar, segundo o pedido do cliente.

Tabela 9 – Cuidados e material a ter em conta na recolha de vários tipos de amostras e respetivas normas de referência.

Amostras	Material	Cuidados	Normas referência
<b>Alimento</b>	Sacos esterilizados	Cuidados de assepsia. Roupa e mãos limpas. Analisar dentro de 24h. Manter a amostra refrigerada durante o transporte.	NP 1828:1982 – “Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas”
<b>Zaragatoa</b>	Molde esterilizado de ~ 25cm <sup>2</sup>	Cuidados de assepsia. Roupa e mãos limpas. Analisar dentro de 24h. Manter a amostra refrigerada durante o transporte.	ISO 18593:2004 – “Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs”
<b>Água</b>	Frasco estéril contendo tiosulfato de sódio	Deve-se escolher uma torneira de água fria. Cuidados de assepsia. A torneira deve ser desinfetada preferencialmente por flamejamento ou, se não for possível, por outro método adequado (hipoclorito ou álcool etílico). Manter a amostra refrigerada durante o transporte.	ISO 5667-1:2006 “Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques”; ISO 5667-3:2012 – “Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples”; ISO 5667-5:2006 “Water quality - Sampling - Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems” ISO 5667-14:1998 “Water quality - Sampling - Part 14: Guidance on quality assurance of environmental water sampling and handling” ISO 19458:2006 “Water quality -- Sampling for microbiological analysis”

### 3.2. Preparação das amostras: Solução-mãe e diluições sucessivas

Aquando a preparação das amostras, deve-se ter em conta os documentos de referência NP 1829:1982 “Preparação de amostras para análise” e NP 2079:1989 “Regras gerais para análise microbiológica”. A preparação da amostra deve conduzir a uma perfeita uniformidade da distribuição dos microrganismos, assegurando todos os cuidados de assepsia de modo a evitar qualquer contaminação.

No caso de preparação das amostras de carne picada dos talhos do presente estudo, são retiradas, com uma espátula estéril, pequenas porções de diferentes zonas da amostra, que são pesadas num saco de amostra estéril até perfazer a quantidade de 10g. Posteriormente deve adicionar-se o volume da solução salina de *Ringers* de forma a perfazer um peso total de 100g (solução-mãe correspondente a diluição 10<sup>-1</sup>). O saco contendo a solução da amostra é posto a agitar no equipamento *Stomacher* (agitação mecânica).



Todos os outros géneros alimentícios a analisar no laboratório seguem um procedimento de preparação semelhante ao da preparação de carne picada, sendo mantidas sempre as condições de assepsia e utilizando sempre utensílios esterilizados. Após pesagem da devida quantidade de amostra, descrita no respetivo método de ensaio de contagem ou pesquisa de microrganismos a executar, é adicionado no saco da amostra o volume da solução indicada no mesmo procedimento, respetivo a 90 vezes a quantidade de amostra pesada, e colocado posteriormente em agitação mecânica para homogeneizar a solução.

Todos os ensaios que exigem a diluição da amostra devem seguir a normal ISO 6887-1: 1999 “Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1 - General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilutions“, para a preparação das respetivas diluições recomendadas.

Primeiramente devem ser preparados e esterilizados em autoclavagem, tubos contendo 9 mL da solução de *Ringer*, para que seja possível, posteriormente preparar as diluições decimais. Após a preparação da amostra (solução-mãe) é retirado 1 mL dessa suspensão com uma pipeta estéril e transferido para um tubo contendo 9 mL de *Ringer*, anteriormente preparado. Deve-se homogeneizar utilizando um *vórtex* para obter a diluição  $10^{-2}$  e, posteriormente, repetir este procedimento para obtenção das sucessivas diluições necessárias usando sempre uma pipeta esterilizada. De forma a evitar danos nos microrganismos por alterações bruscas de temperatura, deve-se utilizar os diluentes à temperatura ambiente. O tempo entre a preparação da suspensão inicial e o início das seguintes diluições decimais não deve exceder os 30 min.

Relativamente ao ensaio de contagem de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, devem ser efetuadas 2 diluições ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), para além da suspensão-mãe inicial. Desta forma, a amostra diluída dez, cem e mil vezes, é analisada de modo a garantir um número de unidades formadores de colónias contáveis, no caso de ocorrer crescimento da bactéria.

### **3.3. Controlo de qualidade dos ensaios microbiológicos**

#### ***Controlo de qualidade interno e externo***

O controlo de qualidade interno e externo é persuadido na norma ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations” para que o laboratório possa avaliar continuamente o seu trabalho e os seus resultados. O principal objetivo do controlo de qualidade interno é assegurar a consistência de resultados no dia-a-dia e a sua conformidade com os critérios bem definidos nas respetivas normas padrão de cada ensaio. Um programa de verificações periódicas é necessário para demonstrar que a variabilidade (entre analistas, entre equipamentos ou entre materiais) está sob controlo. O laboratório também deve ter um controlo de qualidade externo, através da execução de ensaios de proficiência,

interlaboratoriais, utilizando matrizes apropriadas. O programa de controlo de qualidade interno e externo do laboratório *YourLAB S. A.* envolve os seguintes parâmetros explícitos na tabela 10, assim como a frequência e o objetivo de cada medida executada para o controlo de qualidade.

Tabela 10 – Processos internos e externos de controlo de qualidade realizados no laboratório *YourLAB S. A.*

	Controlo	Frequência	Objetivo
Interno	<b>Água desionizada</b>	Micro a 22°C Condutividade	Mensal
		Aspeto físico	A cada lote
		pH	A cada lote
	<b>Meios de Cultura</b>	Controlo positivo e negativo	A cada lote
		Taxa de recuperação	1 por cada lote de fabricante ou anualmente após abertura da embalagem
	<b>Análises</b>	Duplicados	1 por cada série de ensaios
		Branco	1 por cada série de ensaios
		Lentículas	1 pelo menos de 15 em 15 dias
		Controlo positivo e negativo (confirmações)	1 por cada série de confirmações
		Controlo positivo (pesquisas)	3 por trimestre
	<b>Amostragem</b>	Branco de campo	1 por trimestre
		Duplicados	1 por trimestre
		Frascos de amostragem Esterilidade	A cada lote de frascos
			Adequabilidade dos frascos de amostragem
Externo	Ensaio interlaboratoriais	Alimentos: 3/ano Água: 2/ano	Avaliar técnicos e metodologias

### ***Controlo ambiental***

Tendo em conta a norma ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations”, para além dos procedimentos de garantia de qualidade dos ensaios executados e, consequentemente, dos resultados obtidos, deve ser feito mensalmente um controlo ambiental envolvendo todas as áreas de trabalho, assim como todos os equipamentos do laboratório. Desta forma é possível garantir que as condições ambientais do laboratório são as ideais e confirmar

que a higienização de todas as salas e equipamentos é bem executada. Posto isto, são expostas ao ambiente, durante 15 minutos, placas de *Plate Count Agar* (PCA) para efetuar o ensaio de enumeração de microrganismos a 30°C e de *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol* (DRBC) para contagem de bolores e leveduras, em cada uma das áreas e equipamentos a avaliar: “sala de preparação de amostras”, “sala de preparação de meios”, “sala de descontaminação”, “zona de filtração”, “zona de análise e “zona de leitura e confirmação”, em cada uma das quatro estufas, e câmara de fluxo laminar. Ainda, é avaliada a presença de unidades formadoras de colónias de microrganismos a 30°C por cm<sup>2</sup> de superfície, utilizando zaragatoas, em cada uma das bancadas das diferentes áreas de trabalho.

### 3.4. Métodos de pesquisa de microrganismos

Os métodos de pesquisa consistem em métodos padronizados para a deteção da presença ou ausência de microrganismos numa específica quantidade de volume ou massa de produto.

Os microrganismos mais pesquisados no laboratório são a *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, assim como é frequente a execução do ensaio de pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores. Estes métodos são elaborados segundo as respetivas normas padrão descritas na tabela 11, e resumidos nos esquemas 12, 13 e 14, respetivos a cada norma, representados de seguida. No caso de terem de ser executados ensaios de confirmação, devem ser utilizadas colónias puras.

Tabela 11 – Normas respetivas a métodos de referência para pesquisa de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e esporos de *Clostridium* sulfito-redutores.

Microrganismos a pesquisar	Norma Padrão
<i>Salmonella spp.</i>	ISO 6579:2002 “Horizontal method for the detection of <i>Salmonella spp.</i> ”
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1 “Horizontal Method for the detection of <i>Listeria monocytogenes</i> ”
Esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores	NP 2262:1986 “Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores”

#### **Pesquisa de *Salmonella spp.***

A pesquisa de bactérias *Salmonella spp.*, segundo o método padrão ISO 6579:2002 “Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*”, consiste num método relativamente demorado, sendo necessários cerca de 3 a 5 dias (no caso de confirmação) a

concluir o ensaio de deteção de presença/ausência desta bactéria. Este procedimento inclui passos diversificados de enriquecimento e plaqueamento, consoante se pode observar resumidamente na figura 12. Os resultados são apresentados como “ausente em 25g” ou “presente em 25g”.

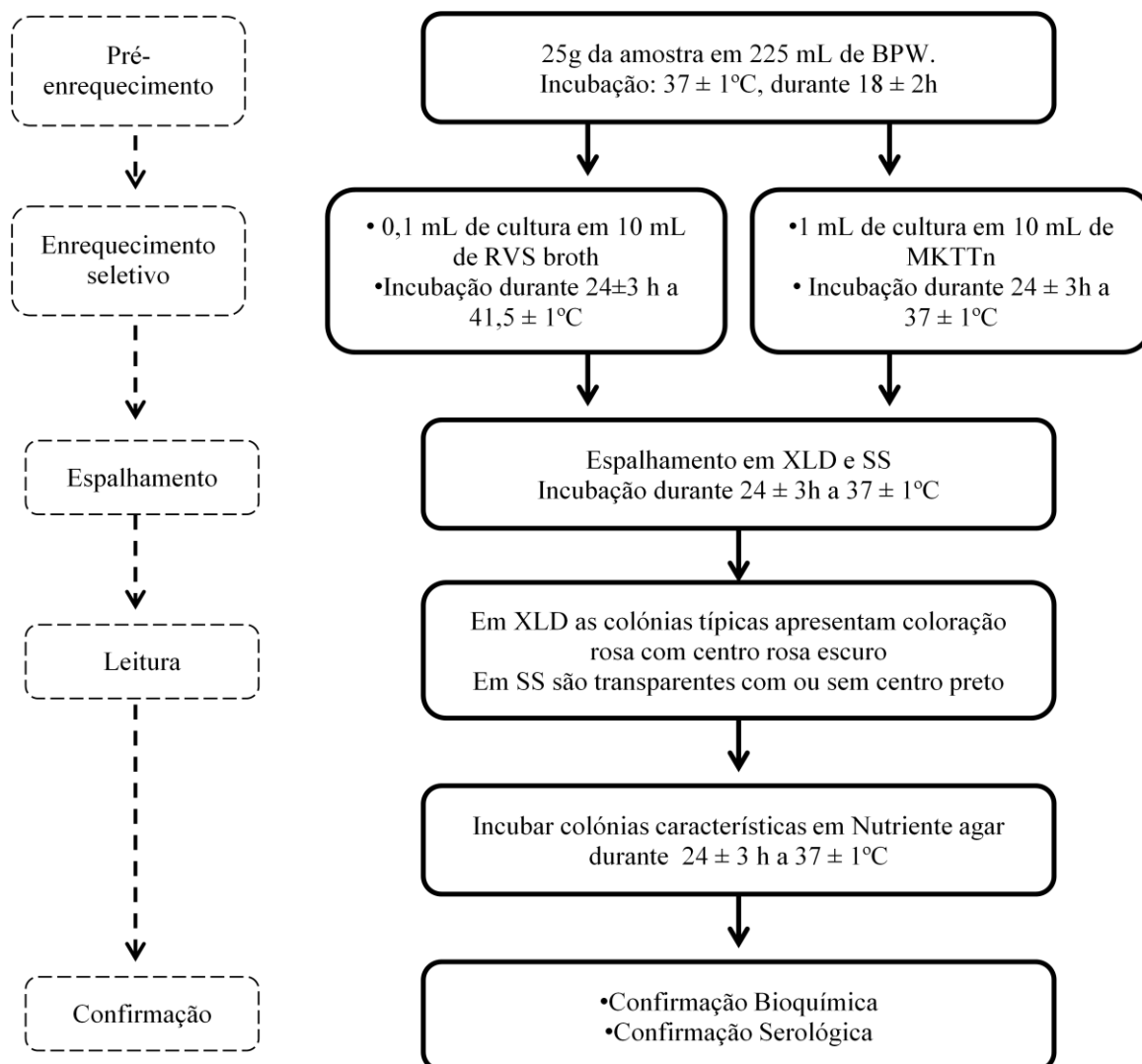


Figura 12 – Esquema resumo do método de pesquisa de *Salmonella spp.* segundo a norma de referência ISO 6579:2002 “Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*”. Designando-se BPW, *Buffered Peptone Water*; RV broth, *Rappaport-Vassiliadis broth*; MKTTn, *Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth*; XLD agar, *Xylose lysine deoxycholate*; SS agar, *Salmonella e Shigella Agar*.

### Pesquisa *Listeria monocytogenes*

O método de pesquisa de *Listeria monocytogenes* consiste num método em que, após um pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo da amostra, esta (em solução) é plaqueada por espalhamento, em meio *Oxford agar*, e em ALOA (*Agar Listeria Ottavani & Agosti*) e incubada durante 24h. Este método exige a execução de três testes para

confirmar a presença de colónias características de bactérias *Listeria monocytogenes*, nas placas de amostra que apresentaram crescimento destas colónias após incubação (figura 13). Os resultados são posteriormente apresentados como “ausente em 25g” ou “presente em 25g”.

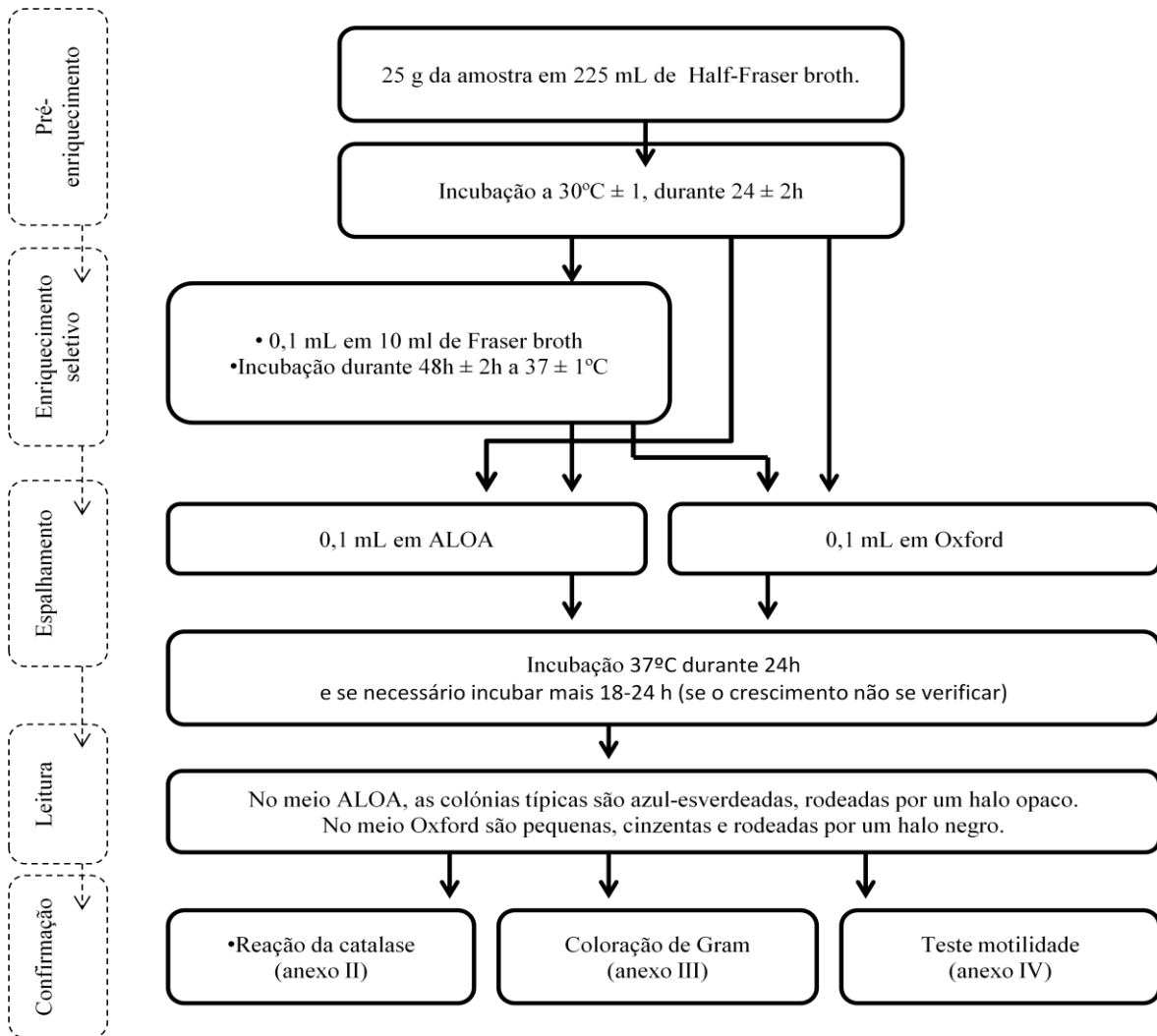


Figura 13 – Método resumido de pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 11290-1:1996 “Horizontal Method for the detection of *Listeria monocytogenes*”. Sendo ALOA, *Agar Listeria Ottavani & Agosti*.

A norma padrão ISO 11290:1996, para além da “Parte 1” respeitante ao ensaio de pesquisa/deteção de *Listeria monocytogenes* também incluiu uma “Parte 2” respeitante ao ensaio de enumeração desta bactéria em alimentos. Enquanto no método de pesquisa apenas é detetada a presença ou ausência da bactéria, o ensaio de enumeração tem o objetivo de contabilizar as unidades formadoras de colónias desta bactéria existentes no alimento. A escolha dos métodos a aplicar na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos relativamente a esta bactéria patogénica é da responsabilidade do cliente.

### *Pesquisa de esporos de Clostridium sulfito-redutores*

O método de pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores é executado com o objetivo de verificar a presença de colónias características de bactérias *Clostridium* sulfito-redutoras, numa quantidade conhecida do produto alimentar em análise. Primeiramente, a solução-mãe da amostra (amostra diluída 10 vezes) colocada em tubo estéril é aquecida a  $80 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, seguido de um arrefecimento rápido, de forma a eliminar as células vegetativas e a ativar os eventuais esporos existentes. De seguida, a amostra deve ser colocada no meio específico *Meat Yeast Agar* (de forma a obter duas diluições diferentes), e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 a 5 dias (figura 14).

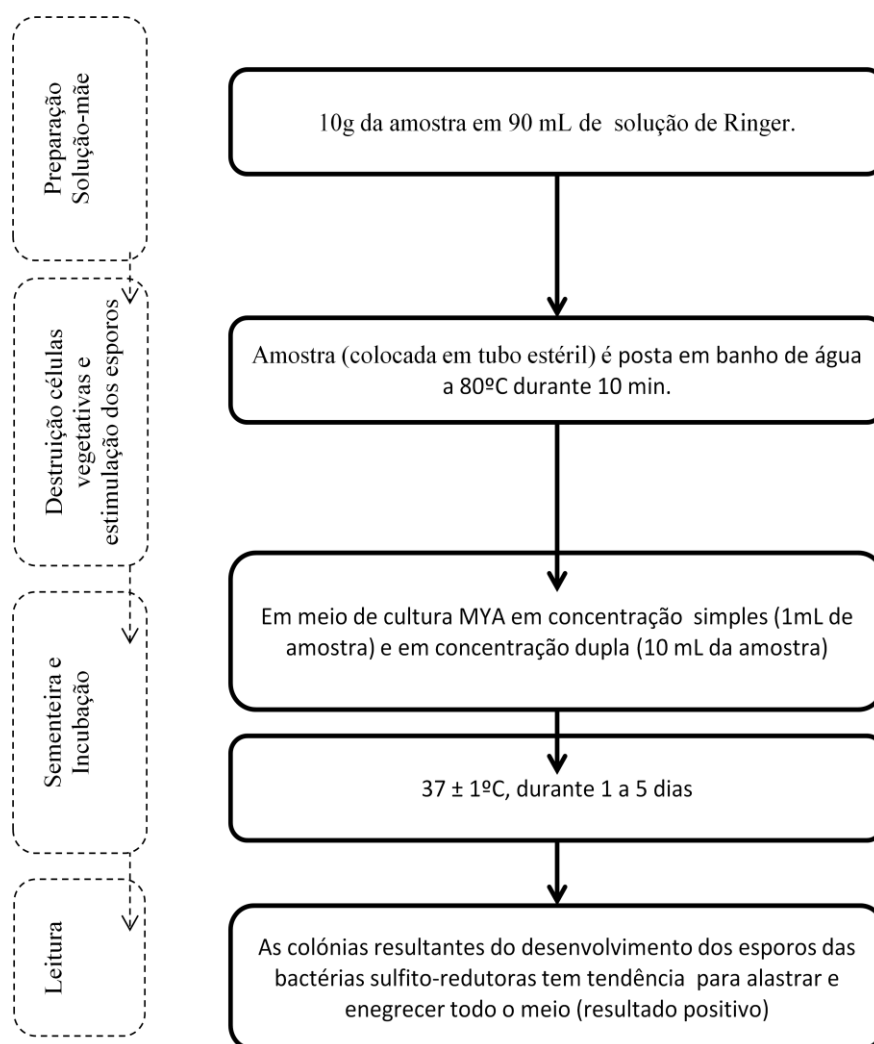


Figura 14 – Esquema de procedimentos de método padrão para pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores, segundo a norma NP 2262:1986 “Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores”. Tendo MYA o significado de *Meat Yeast Agar*.

Os resultados posteriormente são reportados, na forma decimal, como: positivo/negativo em  $10^{d1}$  g e/ou em  $10^{d2}$  g. Em que  $d1$  representa o expoente da mais alta diluição decimal positiva; e  $d2$  representa o expoente da mais baixa diluição decimal negativa.

### 3.5. Métodos de contagem de microrganismos

#### 3.5.1. Métodos gerais de contagem de microrganismos

Os métodos de contagem de microrganismos são muito importantes para avaliar a qualidade microbiológica de géneros alimentícios, pois por vezes não é suficiente saber apenas que certos microrganismos estão presentes, é necessário também saber em que quantidade, para poder ser avaliado o risco. Os procedimentos dos métodos de contagem de microrganismos podem variar segundo a natureza da amostra: género alimentício, zaragatoa e água.

##### *Géneros Alimentícios*

Em cada um dos ensaios de enumeração de microrganismos, devem ser efetuadas e analisadas diferentes diluições da solução-mãe da amostra, de forma a garantir a obtenção de um número de colónias contáveis nas placas após incubação, de acordo com os princípios de qualidade dos métodos descritos na norma ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations”. Na tabela 12 estão descritos resumidamente os diversos métodos de contagem de microrganismos específicos, e também de microrganismos indicadores, associados à respetiva norma padrão. De modo geral, no final de cada ensaio, é efetuada a contagem do número total de colónias ou de colónias típicas, utilizando a seguinte equação (1):

$$(1) \quad N = \frac{\sum C}{V (n1+0,1n2)d}$$

Sendo:  $\sum C$ , a soma das colónias contadas em duas placas contendo duas diluições sucessivas da amostra;  $V$ , o volume de inóculo em cada placa, em mililitros;  $n1$ , o número de placas selecionadas da primeira diluição;  $n2$ , o número de placas selecionadas da segunda diluição;  $d$ , a diluição correspondente à primeira diluição selecionada. No caso de não serem detetadas colónias, o resultado deve, então, ser reportado como “menor do que  $1 \times d$  por mililitro ou por grama”.

Alguns dos métodos, como o ensaio de contagem de colónias de bactérias *Staphylococcus coagulase positiva* e de contagem de *Listeria monocytogenes*, por possuírem procedimentos distintos dos restantes, nomeadamente os testes de confirmação de colónias, exigem mais e outras fórmulas de cálculo. Para calcular, o número  $a$  de estafilococos coagulase positiva confirmados, em cada uma das placas, deve utilizar-se a seguinte equação (2), descrita na respetiva norma NP 4400-1:2001 “Regras gerais para a contagem de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies) Parte 1 - Técnica com confirmação de colónias (método corrente) ”.

$$(2) \quad a = \frac{b^c}{A^c} \times C^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times C^{nc}$$

Sendo:  $A^c$ , o número de colónias características;  $A^{nc}$ , o número de colónias não características repicadas;  $b^c$ , o número de colónias características de *Estafilococos* presumíveis que são coagulase positiva;  $b^{nc}$ , o número de colónias não características de *estafilococos* presumíveis que são coagulase positiva;  $C^c$ , o número total de colónias características de *Estafilococos* coagulase positiva presumíveis por placa;  $C^{nc}$ , o número total de colónias não características de *Estafilococos* coagulase positiva presumíveis por placa.

Respetivamente a contagem de bactérias *Listeria monocytogenes*, o número  $a$  de *L. monocytogenes* identificadas e confirmadas, é calculado com a ajuda da equação (3):

$$(3) \ a = \frac{b}{A} \times C$$

Sendo:  $A$ , o número de colónias características para confirmação;  $b$ , o número de colónias características confirmadas;  $C$ , o número total de colónias características contadas na placa.

Para concluir posteriormente o número de colónias  $N$  (tanto de *estafilococos* coagulase positiva como de *Listeria monocytogenes*), identificadas e confirmadas na amostra em análise, utiliza-se então a equação (1) demonstrada anteriormente.

### ***Zaragatoas***

Os procedimentos de amostragem de zaragatoas e de análise das mesmas, no laboratório *YourLAB S.A.*, seguem a norma padrão ISO 18953:2004 “Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs”. De acordo com esta norma, é analisada a suspensão de *Ringer* presente na zaragatoa a analisar (e se necessário, posteriores diluições decimais) seguindo os procedimentos descritos nos métodos padrão específicos para enumeração das bactérias, ou grupo de microrganismos, a avaliar.

Relativamente aos ensaios que englobam a utilização de meios seletivos, os testes apropriados para confirmação das colónias devem ser executados sempre que as placas das respetivas amostras demonstrarem crescimento de colónias de bactérias características do microrganismo a enumerar. Desta forma, o número de unidades formadoras de colónias do microrganismo específico, por  $\text{cm}^2$ , ou por zaragatoa, é calculado a partir do número de colónias confirmadas.

No laboratório *YourLAB S. A.* a análise de zaragatoas engloba principalmente os ensaios de contagem de microrganismos a 30°C e a contagem de enterobactérias (descritos na tabela 13). Estes ensaios são efetuados principalmente na análise de zaragatoas provenientes dos 22 talhos que compõem o tema principal deste estudo de dissertação, de forma a avaliar higienização e condições sanitárias. Mensalmente são analisadas 2 zaragatoas de cada um dos estabelecimentos, respetivas a um manipulador e a uma superfície do estabelecimento.



Tabela 122 – Resumo de métodos de contagem de microrganismos: princípio do método, meio de cultura utilizada e condições de incubação. Sendo VRBG a designação de *Violet Red Bile Glucose*; TBX, *Tryptone Bile X-glucuronide*; BP, *Baird-Parker*; TSC, *Tryptone Sulfite Cycloserine*; ALOA, *Agar Listeria Ottaviani & Agosti*; VRBL, *Violet Red Bile Lactose Agar*; PCA, *Plate Count Agar*; e DRBC, *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*.

Ensaio de Enumeração de Microrganismos								
Microrganismos	Norma Padrão	Solução-mãe	Método	Meio	Condições de incubação		Limite de detecção	Observações
					t (°C)	T (h)		
Enterobactérias	NP 4137:1991	10g amostra/90g <i>Ringer</i>	Incorporação	VRBG	37 ± 1	24	10 <sup>1</sup> UFC/g	
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	ISO 16649-2:2001	10g amostra/90g <i>Ringer</i>	Incorporação	TBX	44 ± 1	18 a 24	10 <sup>1</sup> UFC/g	
Estafilococos coagulase positiva	NP 4400-1:2002	10g amostra/90g <i>Ringer</i>	Espalhamento	BP	37 ± 1	48 ± 4	10 <sup>2</sup> UFC/g	Adição de suplemento <i>Egg Yolk tellurite</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1	25g amostra/225g <i>Half Fraser Broth</i>	1°	<i>Half Fraser broth</i>	20 ± 2	1h	-	Adição de suplemento <i>Fraser</i>
			2°					
Bactérias coliformes a 30°C	NP 3788:1990	10g amostra/90g <i>Ringer</i>	Incorporação	VRBL	30 ± 1	24 ± 2	10 <sup>1</sup> UFC/g	
Microrganismos a 30°C	NP 4405:2002	10g amostra/90g <i>Ringer</i>	Incorporação	PCA	30 ± 1	72 ± 3	10 <sup>1</sup> UFC/g	
Bolores e leveduras	NP 3277-1:2002	10g amostra/90g <i>Ringer</i>	Incorporação	DRBC	25 ± 1	120	10 <sup>1</sup> UFC/g	

Tabela 13 – Métodos de contagem de microrganismos em amostras de zaragatoas. Significando PCA, *Plate Count Agar* e VRBG, *Violet Red Bile Glucose*

Ensaio de enumeração de microrganismos em zaragatoas						
Microrganismos	Norma Padrão	Método	Meio	Condições de incubação		Limite de deteção
				t (°C)	T (h)	
Contagem de Microrganismos a 30°C	ISO 4833:2003	Incorporação	PCA	30 ± 1	72	1 UFC/cm <sup>2</sup>
Contagem de Enterobactérias	ISO 21528-2: 2004	Incorporação	VRBG	37 ± 1	24	1 UFC/cm <sup>2</sup>

Para calcular o número de microrganismos por cm<sup>2</sup> de superfície a analisar ( $N_s$ ), utiliza-se a seguinte equação (4):

$$(4) N_s = \frac{(N \times F)}{A} \times D$$

Em que: N representa o nº de UFC em 1mL de diluente; F, a quantidade, em mL, de diluente no tubo; A, a área da superfície avaliada em cm<sup>2</sup>; D, a diluição considerada.

### *Análise de águas*

Todos os ensaios de análises de águas envolvem o processo de filtração cuja descrição técnica está definida na norma ISO 8199:1988 “Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture”, com a exceção do ensaio de enumeração de microrganismos cultiváveis a 22°C e 36°C, descrito na norma ISO 6222:1999 “Water quality - Enumeration of culturable microorganisms- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium”, que tem como princípio a incorporação da amostra em nutriente agar.

Nos ensaios de enumeração de famílias ou grupos de microrganismos e bactérias em águas, são filtrados 100 mL da amostra em estudo, usando um filtro de membrana, que é inoculado em meio seletivo e em condições de incubação específicas, dependendo do microrganismo a enumerar (tabela 14). Por sua vez, no método por incorporação, é inoculado 1mL da amostra em meio PCA. Posteriormente, ambos os resultados são expressos em UFC por mL de amostra.

As análises devem ser iniciadas, preferencialmente, imediatamente após obtenção das amostras. Se as amostras são mantidas à temperatura ambiente (> 25°C), o exame deve ser realizado até 6 h após a recolha, e em circunstâncias especiais, as amostras podem ser mantidas a 5 ± 3°C até 24 h antes do exame.

Tabela 14- Métodos de enumeração de microrganismos em águas. Significando EA, *European Agency*; PCA, *Plate Count Agar*; TSC, *Tryptose Sulfite Cycloserine Agar*; e TTC *Triphenyl Tetrazolium Chloride*

Metodologias utilizadas em análise de águas							
Método	Norma Padrão	Método	Meio	Condições de incubação		Limite de detecção	Observações
				t (°C)	T (h)		
Contagem de microrganismos a 36 e 22°C	ISO 6222:1999	Incorporação	Extrato de levedura agar	36 ± 2	44 ± 4	1 UFC/mL	
				22 ± 2	68 ± 4		
<i>Clostridium</i> sulfito-redutores	EA 2010 Part 6	Filtração	TSCA	44 ± 1	21 ± 3	1 UFC /100mL	Condição de anaerobiose
<i>Escherichia coli</i> e bactérias coliformes	ISO 9308-1:2000	Filtração	Agar lactose TTC	36 ± 2	21 ± 3	1 UFC /100mL	
<i>Enterococcus</i> intestinais	ISO 7899-2: 2000	Filtração	Slanetz e Bartley	36 ± 2	44 ± 4	1 UFC /100mL	

### 3.5.2. Método de enumeração de *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva em carne picada

Este método segue a norma de referência ISO 16649-2:2001 “Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-glucuronide”. Após preparação da solução-mãe da amostra de carne picada, deve-se preparar as seguintes diluições de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , conforme descrito anteriormente no subcapítulo 3.2., e de cada suspensão (após agitação no vórtex) deve ser colocado 1mL numa placa de Petri devidamente identificada. De seguida, a amostra é incorporada com o meio agar cromogénico TBX (Tryptona Bile X-Gucoronide), a uma temperatura entre 44 e 47°C. Após solidificação, as placas são colocadas na estufa a  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 h (figura 15). O tempo total de incubação não deve exceder as 24 h.

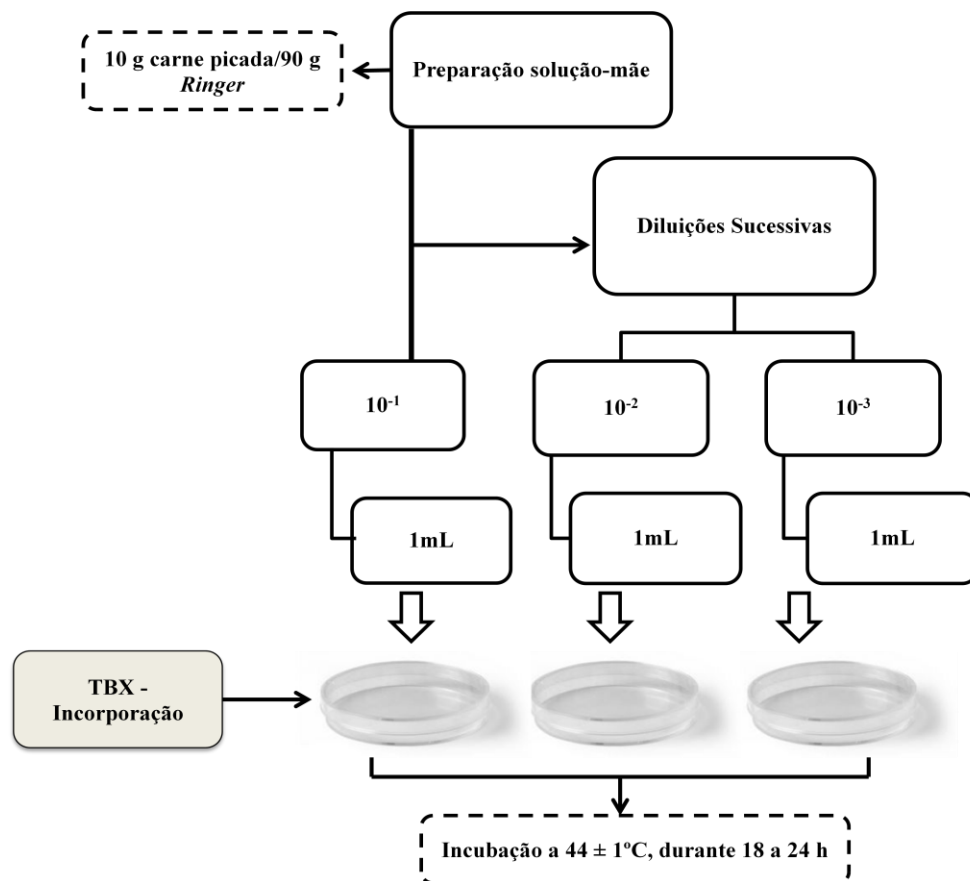


Figura 15 – Esquema representativo do procedimento descrito no método padrão de contagem de *E. coli* β-glucuronidase positiva, realizado segundo a norma padrão ISO 16649-2:2001 “Regras gerais para a contagem de *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva”.

O número de colónias de bactérias *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva ( $N$ ), é calculado segundo a equação (1) utilizada para enumeração de microrganismos em géneros alimentícios, anteriormente apresentada no ponto 3.5.1.. No final de cada ensaio são, então, expressas as UFC de *E. coli* em cada grama de carne picada analisada. No caso de obtenção de placas aparentemente isentas da bactéria em estudo, o resultado é reportado como “ $<1,0 \times 10^1$  UFC/g”, tendo em conta a primeira diluição (solução-mãe) utilizada, correspondendo o valor de  $1,0 \times 10^1$  UFC/g ao limite de deteção.

#### 4. Resultados e discussão

Para além dos resultados interligados ao caso particular de enumeração de *E. coli* β-glucuronidase positiva em carne picada, serão posteriormente apresentados e discutidos os resultados obtidos dos ensaios de enumeração e pesquisa de microrganismos executados com mais frequência no laboratório *YourLAB S. A.*, em produtos alimentares. Resultados de ensaios de análise de águas, bolores e leveduras e outros como ensaios interlaboratoriais e de controlo de qualidade não serão apresentados pois foram executados com pouca frequência e o número de resultados obtidos é muito escasso.

Todos os resultados apresentados neste documento dizem respeito a análises efetuadas no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013, no qual apenas estão inseridos cinco de oito meses em estágio de dissertação de mestrado no laboratório *YourLAB S. A.*: Outubro de 2012 a fevereiro de 2013.

#### **4.1. Enumeração e avaliação da presença de *Escherichia coli* em carne picada**

Tendo em conta o artigo 8º da Portaria 699:2008, descrito em 2.6.4. “Legislação específica aplicada à enumeração de *Escherichia coli* em carne picada”, a avaliação da presença de *E. coli* em carne picada deve ser efetuada mensalmente nos estabelecimentos comerciais de venda de carne. Neste estudo, foram analisadas amostras de carne picada provenientes de 22 talhos distintos, avaliando a conformidade das mesmas relativamente à concentração de bactérias *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva (indicadora de contaminação fecal), de acordo com a legislação vigente. Para além dos valores de *E. coli* nas amostras de carne picada (UFC/g), foram avaliados os valores (UFC/cm<sup>2</sup>) resultantes das análises de zaragoas de superfícies e de manipuladores de cada estabelecimento, relativamente à contaminação por enterobactérias e microrganismos a 30°C. No que diz respeito às amostras de zaragoas é de importância referir o limite crítico de  $1,0 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> para microrganismos a 30°C e  $1,0 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> para enterobactérias, estabelecidos pelo cliente (visto que não existe legislação vigente para este caso).

É de grande importância voltar a salientar que a recolha das amostras nos respetivos talhos foi feita sob aviso prévio e, para além disso, todas as amostras relativas a zaragoas, tanto de superfícies como da mão de manipuladores foram adquiridas após higienização pelos talhantes.

De todas as 2175 amostras analisadas ao longo do período considerado, a maior parte (55,6%) apresentaram resultados satisfatórios, inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g. Ainda, 19,91% das amostras apresentaram níveis aceitáveis de UFC de *E.coli*/g entre  $1,0 \times 10^1$  e  $4,9 \times 10^1$ , perfazendo um total de 75,5% de amostras abaixo do valor inferior do intervalo crítico estabelecido no artigo 8º da Portaria n.º 699:2008: entre  $5,0 \times 10^1$  UFC/g e  $5,0 \times 10^2$  UFC/g. Dentro deste intervalo crítico foram observados resultados relativamente a 18,4% das amostras, enquanto uma percentagem de 6,0% apresentaram valores de *E. coli* iguais ou superiores a  $5,01 \times 10^2$  UFC/g (figura 16). De acordo com a Portaria 699:2008, as 5 amostras de carne picada analisadas mensalmente são consideradas em não-conformidade se mais do que duas das amostras apresentarem concentrações de *E. coli* em valores compreendidos no intervalo crítico ou se alguma delas apresentar concentrações superiores ao limite crítico de  $5,0 \times 10^2$  UFC/g.

Deste modo, durante os 20 meses considerados, o conjunto dos 22 estabelecimentos apresentou no global uma percentagem de 75,7% das amostras em conformidade com a legislação e 23,2% de amostras não conformes, estando em falta 1,1% de dados relativos a alguns meses, como demonstrado na figura 17.

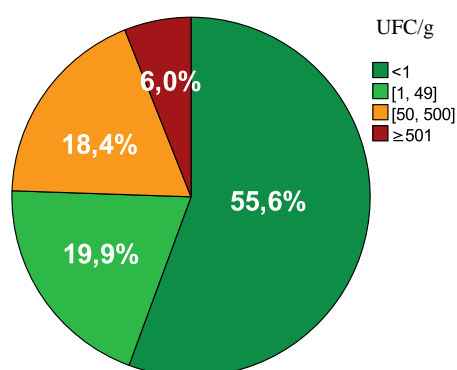


Figura 16 - Percentagem de amostras nos respetivos intervalos de concentração de *E. coli* (UFC/g), relativas ao conjunto de amostras dos 22 talhos ao longo de 20 meses.

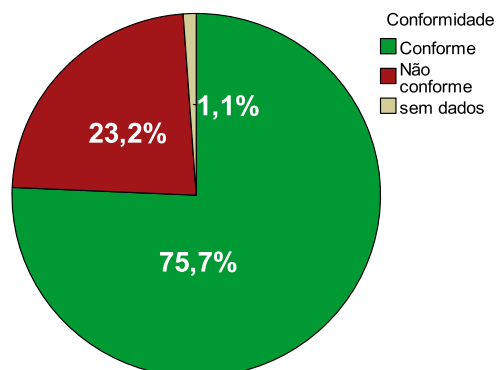


Figura 17 - Percentagem de meses com amostras em conformidade/não conformidade com os critérios estabelecidos na Portaria 699:2008, no conjunto dos 22 talhos.

No que diz respeito ao número de não-conformidades das amostras, foi verificado que cada talho apresentou, em média, 25% das análises mensais em valores insatisfatórios relativamente aos valores de UFC de *E. coli* nas 5 amostras de carne picada. O valor máximo de não-conformidade das amostras foi de 9 e foi verificado em dois talhos: no talho n.º 1 e n.º 5, conforme se pode observar na figura 18 na qual é demonstrado o número de não-conformidades/conformidades ao longo do tempo em cada um dos estabelecimentos. Apenas um estabelecimento (talho n.º 14) demonstrou as amostras isentas de contaminação por *E. coli*, no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013 (figura 18).

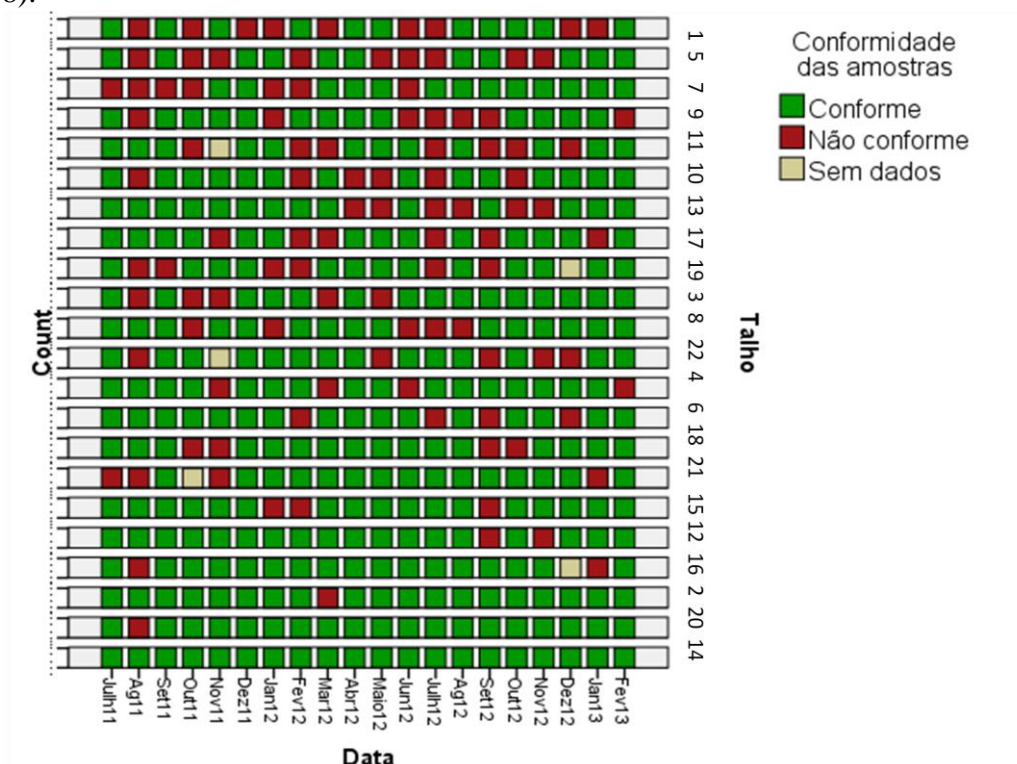


Figura 18 - Conformidade das amostras de carne picada relativamente a contaminação por *E. coli*, em cada um dos estabelecimentos, no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013. Dados apresentados em ordem decrescente de acordo com o número de não-conformidades das amostras.

Uma das hipóteses colocadas no início deste estudo supunha que a frequência de contaminação das carnes picadas por *E. coli* diminuiria ao longo dos meses, pois a tendência após alertar os respectivos estabelecimentos (e estes, por sua vez, possivelmente alertar os fornecedores), seria de obtenção de valores cada vez mais satisfatórios. Contudo, conforme se pode observar na figura 18, não existe nenhum padrão decrescente relativo ao número de não-conformidades, com exceção de apenas 2 talhos (talho n.º 3 e n.º 7). Estes dois estabelecimentos, apesar de terem apresentado um número de 5 e 7 não-conformidades, até ao mês de maio e junho de 2012, respetivamente, não apresentaram mais nenhuma não-conformidade até ao último mês considerado (fevereiro de 2013). Contrariamente ao esperado, o talho n.º 13 apresentou, ao longo do tempo, um aumento na frequência de número de meses em que se verificaram valores de concentração de *E. coli* nas amostras de carne picada não satisfatórios de acordo com a legislação (figura 18).

Dentro dos fatores de risco falados anteriormente no capítulo introdutório, os principais que poderão estar associados à contaminação de carne picada por *E. coli*, são os aspetos associados à fonte da matéria-prima, o gado e o ambiente que o envolve, assim como o processo de abate no matadouro (73). Apesar disso, o número de unidades formadoras de colónias desta bactéria pode aumentar na carne exposta e manipulada nos estabelecimentos comerciais, se não se realizarem as práticas corretas e se não forem monitorizados corretamente os pontos críticos de controlo descritos no plano HACCP elaborado no estabelecimento (75). Desta forma, foi colocado como hipótese que poderia haver alguma correlação entre os valores de concentração elevados de *E. coli* nas amostras de carne picada com valores insatisfatórios de microrganismos a 30°C e/ou enterobactérias nas superfícies e manipuladores dos estabelecimentos.

Devido ao elevado número de talhos analisados, apenas serão comentados alguns casos. Os resultados relativos aos talhos não comentados neste documento estão presentes no Anexo I – “resultados relativos a enumeração de *Escherichia coli* em carnes picadas dos diversos talhos, e enumeração de microrganismos a 30°C e enterobactérias em superfícies e manipuladores”.

O gráfico da figura 19 demonstra os resultados das 5 amostras de carne picada analisadas em cada mês no estabelecimento n.º 1 (que apresentou um número máximo de não-conformidades), no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013. Estes resultados estão agrupados de acordo com diferentes intervalos e limites críticos: inferior ao limite de deteção (<10 UFC/g), intervalo de valores ainda satisfatórios ([10, 49] UFC/g), intervalo de valores críticos ([50,500]) e superior ao limite crítico ( $\geq 501$ ), tendo em conta a legislação vigente. Paralelamente, o gráfico da figura 20 (com o apoio da tabela 15) demonstra, ao longo do mesmo período, os valores mensais relativos à contaminação de superfícies e manipuladores do mesmo estabelecimento, por enterobactérias e microrganismos a 30°C.

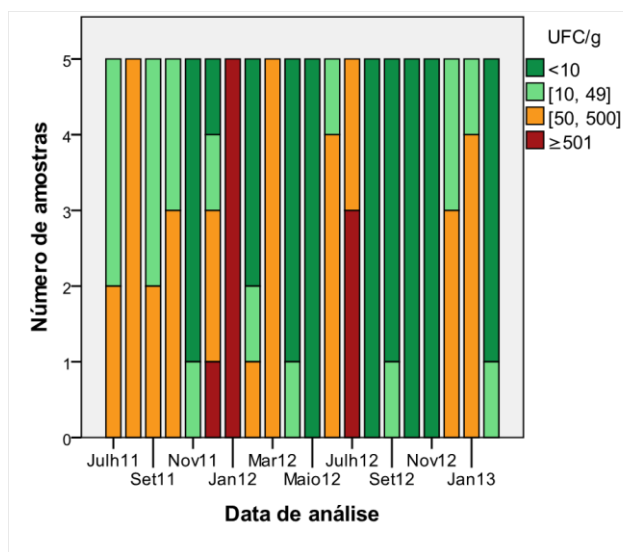


Figura 20 - Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de *E. coli* (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º1.

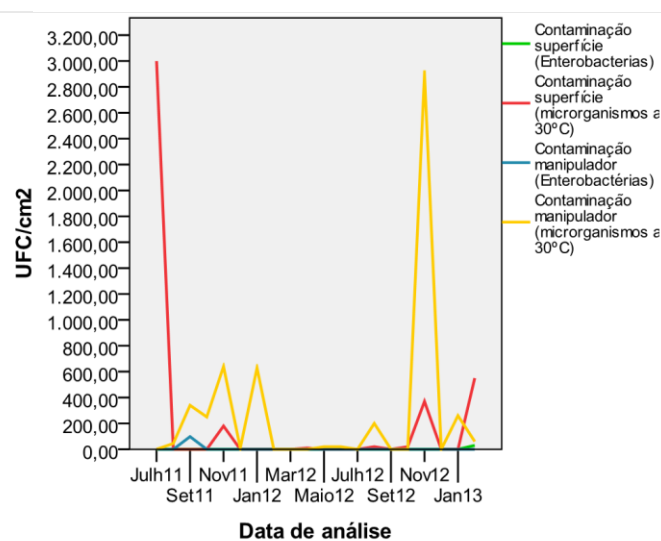


Figura 19 – Valores (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho 1, em cada mês de estudo.

Tabela 15 - Concentração (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho 1, em cada mês de análise. Sendo “Entero.” a abreviatura para *enterobactérias* e M30 para *microrganismos a 30°C*.

2011						2012					
Zaragatoa	Análise	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr
Superfície	Entero.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	3000	0	0	0	180	0	0	0	0	10
Manipulador	Entero.	0	0	98	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	45	340	250	640	10	630	0	0	0
2012						2013					
Zaragatoa	Análise	Maio	Jun	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Superfície	Entero.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
	M30	0	0	0	20	0	20	370	0	0	550
Manipulador	Entero.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	20	20	0	200	0	0	2900	0	260	60

Tendo em conta a hipótese considerada anteriormente, verificou-se que em 3 dos 9 meses (outubro de 2011, janeiro de 2012 e janeiro de 2013) em que as amostras de carne picada se apresentaram em não-conformidade relativamente aos níveis de contaminação por *E. coli*, também se demonstraram valores insatisfatórios de microrganismos a 30°C nas mãos do manipulador, sendo estes de, respetivamente, 250, 630 e 260 UFC/cm<sup>2</sup> (tabela



15). A mesma correlação entre valores insatisfatórios relativos a estes parâmetros verificou-se, por exemplo, no estabelecimento 5 no mês de outubro e novembro de 2011, no estabelecimento 9 no mês de fevereiro de 2013 e no estabelecimento 12 no mês de julho de 2012 (Anexo I). Nos restantes 6 meses (agosto e dezembro de 2011 e março, junho, julho e dezembro de 2012), ainda respetivos ao estabelecimento 1, apesar de as amostras de carne picada terem demonstrado concentrações insatisfatórias de bactérias *E. coli* (figura 19), as análises de zaragoas de superfície e manipulador nesses meses não revelaram contaminação por microrganismos a 30°C e/ou por enterobactérias (figura 20, tabela 15). De uma perspetiva complementar verifica-se que, em alguns dos meses, como é o caso do mês de novembro de 2012, apesar de as análises das respetivas zaragoas terem revelado uma elevada concentração de microrganismos a 30°C no manipulador (640 UFC/cm<sup>2</sup>) e também numa faca de corte (180 UFC/cm<sup>2</sup>), o estabelecimento não apresenta, nesse mês, não-conformidade relativamente às amostras de carne picada (figura 19, tabela 15).

De forma semelhante verificou-se que o talho n.º 14, apesar de ser o único que apresentou todas as amostras de carne picada em conformidade com a Portaria 699:2008, ao longo de todos os meses de análise (figura 18 e figura 21), apresentou uma grande concentração de microrganismos a 30°C de 190 UFC/cm<sup>2</sup>, 810 UFC/cm<sup>2</sup> e 1100 UFC/cm<sup>2</sup> no manipulador nos meses de dezembro de 2011 e novembro e dezembro de 2012 (figura 22, tabela 16). Paralelamente, também foi notável uma elevada concentração de microrganismos a 30°C nas superfícies analisadas (tábua de corte e faca) no mês de novembro de 2011 e janeiro de 2013, apresentando valores de 580 e 1100 UFC/cm<sup>2</sup>, respetivamente (figura 22).

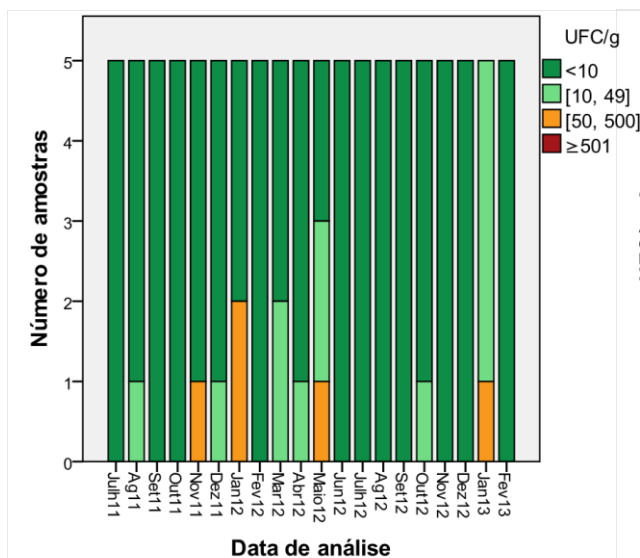


Figura 22 – Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de *E. coli* (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º14.

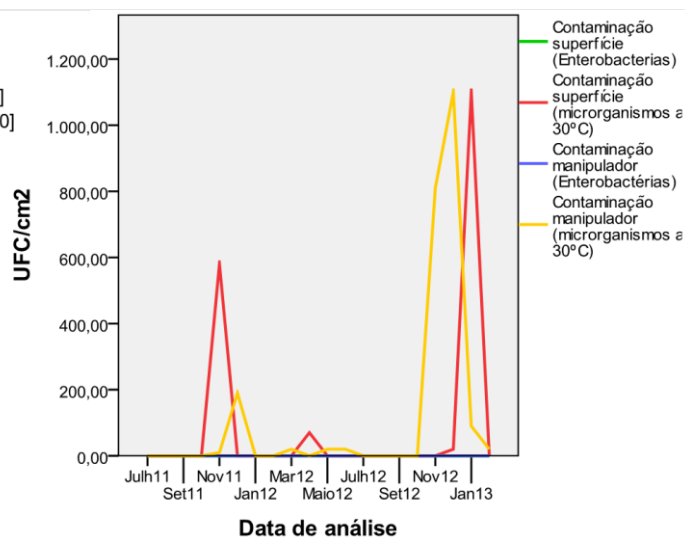


Figura 21 - Valores (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragoas, superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de estudo.

Tabela 16 - Concentração (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de análise. Sendo “Entero.” a abreviatura para *enterobactérias* e “M30” para *microrganismos a 30°C*.

		2011						2012			
Zaragatoa	Análise	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr
Superfície	Entero.	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	-	0	0	0	580	0	0	0	0	70
Manipulador	Entero.	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	-	0	0	0	10	190	0	0	20	0
		2012						2013			
Zaragatoa	Análise	Maio	Jun	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Superfície	Entero.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	0	0	0	0	0	0	20	1100	0
Manipulador	Entero.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	20	20	0	0	0	0	810	1100	90	20

Ainda, reparou-se que no estabelecimento n.º 2, apesar de no mês de agosto de 2012 a análise à zaragatoa do manipulador ter revelado uma concentração de enterobactérias no manipulador de 1300 UFC/cm<sup>2</sup>, as amostras de carne picada apresentaram nesse mês, valores inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC de *E. coli*/g (figura 23 e 24 e tabela 17). Este valor elevado de enterobactérias representa um grande indicativo de higienização inadequada por parte do manipulador (que lavou as mãos antes da análise) e, para além disso pode indicar a presença de bactérias patogénicas pertencentes a esta família de bactérias, como é o caso da *E. coli*.

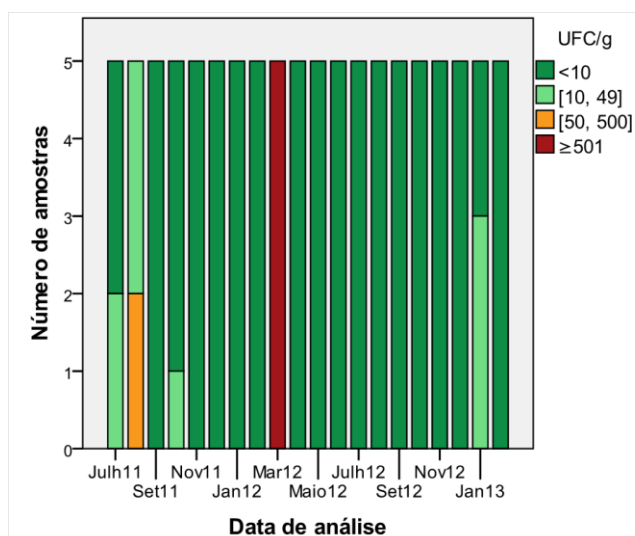


Figura 24 - Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de *E. coli* (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º 2

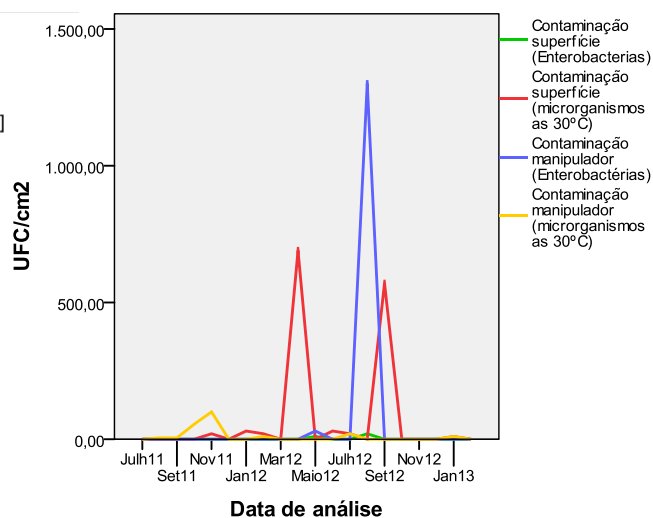


Figura 23 - Valores (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho n.º 2, em cada mês de estudo.

Tabela 17 – Concentração (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respectivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de análise. Sendo “Entero.” a abreviatura para *enterobactérias* e M30 para *microrganismos a 30°C*.

		2011						2012			
Zaragatoa	Análise	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr
Superfície	Entero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	0	0	0	20	0	30	20	0	690
Manipulador	Entero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	5	5	55	100	0	0	10	0	0
		2012						2013			
Zaragatoa	Análise	Mai	Jun	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Superfície	Entero	10	0	0	20	0	0	0	0	0	0
	M30	0	30	20	0	570	0	0	0	10	0
Manipulador	Entero	30	0	0	1300	0	0	0	0	0	0
	M30	0	0	20	0	0	0	0	0	10	0

Além disso, verificou-se que um dos estabelecimentos (talho n.º 7), apesar de apresentar sete meses com valores não-conformes de *E. coli* nas amostras de carne picada (figura 25), foi o que demonstrou uma melhor higienização por parte dos manipuladores e em superfícies. Este talho apresentou apenas um valor resultante da análise de zaragatoas acima do valor crítico estabelecido pelo cliente: uma contaminação de 960 UFC/cm<sup>2</sup> respectiva a microrganismos a 30°C no manipulador, no mês de maio de 2012 (gráfico 26, tabela 18). Apesar disso, nesse mês de maio de 2012, as 5 amostras de carne picada analisadas, demonstraram valores de *E. coli* inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g (figura 25).

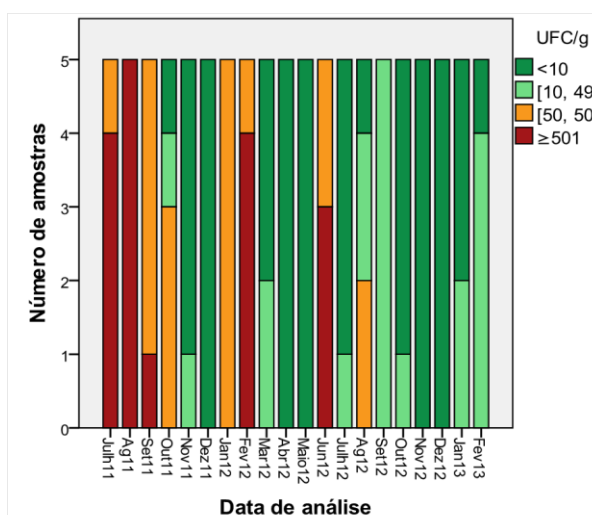


Figura 26 - Número de amostras de carne picada com diferentes intervalos de concentração de *E. coli* (UFC/g) resultantes da enumeração desta bactéria em cada 5 amostras de carne picada mensais, no estabelecimento n.º 7.

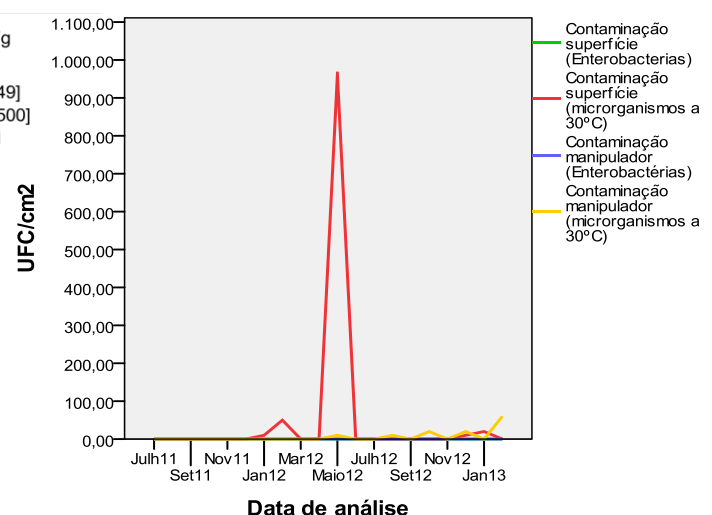


Figura 25 - Valores (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respectivas a superfícies e manipuladores, no talho n.º 7, em cada mês de estudo.

Tabela 18 – Concentração (UFC/cm<sup>2</sup>) de microrganismos a 30°C e enterobactérias em zaragatoas respetivas a superfícies e manipuladores, no talho 14, em cada mês de análise. Sendo “Entero.” a abreviatura para *enterobactérias* e M30 para *microrganismos a 30°C*.

		2011						2012			
Zaragatoa	Análise	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr
Superfície	Entero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	0	0	0	0	0	10	50	0	0
Manipulador	Entero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2012						2013			
Zaragatoa	Análise	Maio	Jun	Julh	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Superfície	Entero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	960	0	0	0	0	0	0	10	20	0
Manipulador	Entero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	10	0	0	10	0	20	0	20	0	60

A verificação de que maior parte das amostras de carne picada em não-conformidade com a legislação não são coincidentes com valores indicativos de uma higienização inadequada em superfícies e manipuladores dos diversos talhos reforça a ideia de que a origem da bactéria *E. coli* incide-se principalmente em aspetos anteriores à chegada da carne ao talho.

O local de criação dos animais pode ter afetado os níveis de *E. coli* no animal, no caso de este não possuir as melhores condições de espaço e higiene. Estudos indicam que animais que crescem e pastam ao ar livre possuem menor carga microbiológica visto que o contacto entre estes animais é menor (114). Para além disso, é muito provável que o animal contenha na pele resíduos de fluidos corporais como urina, sangue, leite, mucos, fluido do rúmen e intestinal, os quais podem constituir fortes fontes de contaminação das carcaças, incluindo contaminação por *E. coli*. Outros fatores que podem ter influenciado a presença de *E. coli* nas amostras podem estar associados ao transporte do animal para o matadouro se o tipo de transporte e a limpeza do mesmo, a distância e a duração da viagem e número de animais transportados não foram adequados. Ainda, a interrupção da alimentação dos animais mesmo antes do transporte, durante o transporte e enquanto estão em espera no matadouro, afeta o crescimento de potenciais patogénicos no rúmen e o derrame de bactérias fecais, entre elas, *E. coli* (115).

Aquando o processo de abate deve ser seguido muito bem o plano de HACCP e as Boas Práticas de Fabrico, que por sua vez se devem focar em controlar as fontes de contaminação durante o abate, e na inspeção da carne. Para a maioria das operações, apenas é possível reduzir a extensão da contaminação durante o processamento,

melhorando o nível de higiene (116). Embora as técnicas de processamento e abate variem entre matadouros, os passos base são todos semelhantes. O processo de retirar a pele e evisceração das carcaças são considerados os procedimentos que depositam maiores quantidades de organismos fecais nas carcaças, dos quais a bactéria *E. coli*. Para além disso, nas salas de abate, as paredes e o chão podem acumular sujidade, fezes e fluidos corporais. Fluidos estes que podem atingir a carcaça, manipuladores, superfícies e equipamentos e, desta forma, também contaminar outras carcaças que surjam posteriormente no mesmo espaço ou que entrem em contato com os mesmos utensílios e manipuladores (115). Posto isto, o processo de lavagem de carcaças e dos utensílios utilizados no processo de abate constituem pontos críticos importantes na qualidade microbiológica da carne.

Relativamente ao processo de lavagem das carcaças, a efetividade do processo depende da qualidade da água e volume, força, ângulo e duração do fluxo de água, e também da limpeza e qualidade do equipamento de pulverização de água. Maiores pressões no fluxo de água aplicado podem ser mais efetivas na remoção das bactérias das carcaças, mas se a pressão for demasiado elevada, a água também pode introduzir partículas do tamanho da bactéria nas superfícies da carne (117).

Um dos utensílios mais utilizados e mais importantes no processo de abate são as facas de corte. Relativamente à lavagem deste material por parte dos matadouros implicados neste estudo, o mais provável é ter sido executada segundo o processo tradicional, bem aceite e muito utilizado internacionalmente. Este procedimento tradicional de lavagem de facas, executado com o objetivo de evitar a contaminação cruzada entre as diferentes carcaças dos animais, consiste num processo em que, primeiramente, os manipuladores limpam as facas mergulhando-os em água morna (20-40°C) para remover partículas solidas e, posteriormente, são colocadas numa água não menos quente do que 82°C. Contudo, um estudo indicou que os organismos fecais nem sempre são removidos durante a limpeza das facas e a presença desses organismos na carne está muitas vezes relacionada com a acumulação dos microrganismos neste utensílio mesmo após lavagem. Deste modo, as facas usadas para processamentos mais “sujos” (como incisão de couro/pele) que implicam zonas de contaminação fecal, são mais prováveis de conter *E. coli* e níveis de contagem de microrganismos aeróbicos em valores superiores a 100 UFC/cm<sup>2</sup> após imersão da faca a 82°C (118).

De modo geral, a tendência ao longo de todo o processamento das carcaças, desde o processo de abate até à refrigeração da carne, é de obtenção de um decréscimo no número colónias de bactérias *E. coli* na carne. Este facto foi investigado por um estudo em bovinos, em que foi verificado que a presença e prevalência de *E. coli* nas carcaças decresceu significativamente desde o processo de abate, lavagem e refrigeração, mais precisamente com um decréscimo de 88,79% de carcaças contaminadas por *E. coli* para 11,3% das carcaças. Estas conclusões sugerem que as intervenções antimicrobianas podem reduzir efetivamente a concentração de *E. coli* nas carcaças em alguma extensão, contudo, muitas

carcaças ainda continham presente a bactéria, sendo sugerido nesse estudo, que se deveriam desenvolver novas estratégias e intervenções (119).

Posto isto, é aconselhável aos estabelecimentos deste estudo que demonstraram várias análises em não-conformidade com a Portaria 699:2008 para se certificarem novamente da qualidade dos seus fornecedores. Tendo em conta que várias amostras de carne picada demonstraram contaminação pela bactéria *E. coli* (indicadora de contaminação fecal), é também de grande importância salientar e aconselhar os consumidores a confeccionar bem este produto, cozinhando-o em tempo e temperaturas adequadas para eliminar as bactérias *E. coli* possivelmente existentes. Apesar de a bactéria *E. coli* ser enumerada como indicadora fecal através do método utilizado neste estudo, esta bactéria também pode indicar a possibilidade de presença de alguns serotipos patogénicos nas amostras de carne picada, visto que cerca de 98% das estirpes de *E. coli* produzem esta enzima (51).

Apesar da origem da bactéria *E. coli* detetada e enumerada nas amostras de carne picada se incidir principalmente em aspetos anterior à chegada da carne aos talhos, é de importância referir que alguns aspetos como a temperatura de armazenamento e exposição da carne nos talhos não foram controlados neste estudo e podem ter tido alguma influência no crescimento da bactéria neste produto. Para além disso, o processo e o equipamento de moagem não foram bem monitorizados em cada talho, ao longo dos meses considerados. Visto que, tal como referido no capítulo introdutório, o processo de moagem pode provocar a libertação de fluídos da carne (80), se não for feita uma higienização adequada do equipamento estes fluídos podem permanecer no mesmo, juntamente com possíveis restos de carne (que poderão conter *E. coli*). Desta forma, ao serem introduzidas novas carnes para moagem no equipamento estas poderão, por contaminação cruzada, contrair a bactéria *E. coli* ou, no caso de esta bactéria já estar presente na carne, aumentar a sua concentração. Posto isto, este equipamento consiste num ponto crítico de controlo que os talhantes deveriam ter todo o cuidado em monitorizar, mantendo a máquina o mais limpa possível e em temperaturas baixas (assegurando que a carne não sofre um aumento de temperatura). Foram efetuadas análises a superfícies da máquina picadora de carne em apenas 8 dos 22 talhos, durante todo o período de estudo. Três das amostras de zaragatoas de superfície do equipamento de moagem demonstraram a presença de microrganismos a 30°C em concentrações acima do limite crítico estabelecido pelo cliente (tabela 19). Ainda, verificou-se um resultado insatisfatório relativamente à presença de enterobactérias cuja concentração foi de  $4,8 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>. Estes resultados indicativos de má higienização do equipamento de moagem não são coincidentes com valores insatisfatórios de *E. coli* nas amostras de carne picada, com exceção dos resultados obtidos no mês de agosto de 2011, no talho 16, em que se verificou uma concentração de  $1,1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> de microrganismos a 30°C no equipamento (tabela 19).

Tabela 19 – valores de análises de zaragoas respetivas à máquinas de moagem de carne picada, nos respetivos talhos, e comparação com conformidade das amostras de carne picada nos respetivos meses de análise. Sendo utilizada a abreviatura “MOs” para designação de *microrganismos*.

Talho (n.º)	Data	Enterobacterias (UFC/cm <sup>2</sup> )	MOs a 30°C (UFC/cm <sup>2</sup> )	Conformidade Carne picada
4	Julho 2011	<1,0	6,2 x 10 <sup>2</sup>	Conforme
4	Setembro 2011	<1,0	2,0 x 10 <sup>1</sup>	Conforme
4	Outubro 2012	<1,0	<1,0	Conforme
6	Agosto 2011	<1,0	<1,0	Conforme
6	Novembro 2011	<1,0	<1,0	Conforme
16	Agosto 2011	<1,0	1,1 x 10 <sup>2</sup>	Não conforme
16	Setembro 2011	<1,0	<1,0	Conforme
9	Setembro 2011	4,8 x 10 <sup>1</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	Conforme
10	Novembro 2011	<1,0	5,0 x 10 <sup>1</sup>	Conforme
18	Março 2012	<1,0	1,0 x 10 <sup>1</sup>	Conforme
7	Julho 2012	<1,0	<1,0	Conforme
14	Outubro 2012	<1,0	<1,0	Conforme

Nos meses em que se verificou coincidência de valores insatisfatórios resultantes da avaliação de higienização de superfícies e manipuladores, com valores não-conformes de *E. coli* nas amostras de carne picada, podem estar refletidos aspetos como falta de formação por parte dos talhantes e a utilização de um detergente pouco adequado aquando higienização das mãos e/ou superfícies.

Um estudo realizado em Portugal comparou o conhecimento entre talhantes, com e sem formação, aos quais foram colocadas questões de conhecimento teórico e questões práticas. Os grupos de trabalhadores foram divididos em quatro grupos consoante a sua formação: formação acerca de Boas Práticas na Indústria Alimentar; Segurança e Higiene no Trabalho; ambas as formações; sem formação. O grupo de trabalhadores sem formação (24,7% dos questionados) apresentou apenas uma percentagem de 47,89% de respostas corretas a nível de conhecimento teórico e 63,44% a nível prático. Contudo esta última percentagem foi superior ao grupo que teve formação em Higiene e Segurança no Trabalho, o que indica que há realmente falta de formação geral ou formação pouco eficaz. As questões mais problemáticas e mais críticas do questionário revelaram ser “o que é HACCP?”, “diferentes passos efetuados para uma correta higienização das mãos” com apenas, respetivamente, 17,9% e 43,6% de respostas corretas por parte dos trabalhadores sem formação, e “intervalos de temperatura e preservação da carne” em que apenas 25,6% dos trabalhadores sem formação e 27,8% dos trabalhadores com formação em Segurança no Trabalho e Higiene responderam corretamente, entre outras (120). Posto isto, é

aconselhável formação aos manipuladores dos estabelecimentos inseridos neste estudo que não possuam formação a nível de Boas Práticas na Indústria Alimentar e Segurança e Higiene no Trabalho, ou ainda, um reforço da formação nos trabalhadores de estabelecimentos que apresentaram mais resultados insatisfatórios (tanto nas amostras de carne picada como de zaragoas). Seria de grande interesse aplicar um questionário semelhante aos trabalhadores de cada um dos 22 talhos incluídos neste estudo.

Um outro estudo utilizou um modelo de avaliação quantitativa de risco microbiano (QMRA, *Quantitative microbial risk assessment*) para estimar os benefícios resultantes do uso de diferentes produtos para higienização das mãos contendo ingredientes antimicrobianos. Utilizando a bactéria *E. coli* e *E. coli* O157:H7 como bactérias teste, foi demonstrada uma maior eficiência de higienização em mãos de manipuladores com a utilização de produtos contendo álcool ou *chlorhexidine* como ingredientes ativos, comparativamente aos produtos com *triclosan*. Contudo, ambos se destacaram relativamente a produtos comerciais não antibacterianos (121).

Analisando os resultados provenientes da análise e zaragoas de manipuladores e superfícies, respeitantes aos 22 estabelecimentos (tabela 20), verifica-se que pode realmente existir a possibilidade que os talhantes realizar más práticas de higiene no trabalho, principalmente devido a falta de formação.

Nas superfícies e manipuladores analisados, apenas 0,7% e 0,9% dos resultados de contagem de enterobactérias se apresentaram acima do valor crítico de  $1,0 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>, respetivamente. Contudo, a percentagem de amostras de zaragoas com concentrações de microrganismos a 30°C em valores não aceitáveis revelou-se superior comparativamente a contaminação por enterobactérias, sendo de 11,8% em superfícies e 14,8% em manipuladores. Apenas uma percentagem de 53,9% das amostras de zaragoas de manipuladores revelaram valores de microrganismos a 30°C inferiores ao limite de deteção de 1 UFC/cm<sup>2</sup> (tabela 20).

Tabela 20 – Valores de concentração (UFC/cm<sup>2</sup>) de enterobactérias e microrganismos a 30°C em superfícies e manipuladores dos 22 estabelecimentos. Sendo utilizada a abreviatura “MOs” para designação de *microrganismos*.

Enterobactérias (UFC/cm <sup>2</sup> )	Superfícies (%)	Manipuladores (%)	MOs a 30°C (UFC/cm <sup>2</sup> )	Superfícies (%)	Manipuladores (%)
<1	99,0	98,6	<1	65,9	53,9
[1,0; 10,0]	0,2	0,5	[1,0; 100,0]	22,4	31,3
>10,0	0,7	0,9	>100,0	11,8	14,8



#### 4.2. Enumeração e pesquisa de microrganismos em alimentos: resultados e discussão

Os dados apresentados de seguida englobam análises não só a alimentos prontos a consumir mas também a alguns alimentos frescos, e são relativos a um período entre julho de 2011 e fevereiro de 2013. Estes dois conjuntos distintos foram avaliados consoante os limites de aceitabilidade descritos na tabela de valores guia (tabela 5) presente na pág. 29 no presente documento, contudo, os produtos avaliados neste estudo, não foram diferenciados de acordo com os três grupos alimentares descritos na tabela 4, pois a descrição da confeção e/ou ingredientes incluídos nestes alimentos não está bem especificada. As amostras analisadas neste estudo apenas foram diferenciadas em dois grupos: alimentos confeccionados e alimentos frescos.

Nos ensaios de contagem são avaliadas as concentrações dos microrganismos na amostra, enquanto nos ensaios de pesquisa apenas é avaliada a presença ou ausência do microrganismo no produto, pois apenas a confirmação da presença da bactéria a pesquisar é suficiente para intitular a amostra como insatisfatória.

##### 4.2.1. Contagem de microrganismos em alimentos frescos e processados

###### *Microrganismos a 30°C*

Das 723 amostras analisadas relativamente à concentração de microrganismos a 30°C, 83,7 % correspondem a alimentos confeccionados, enquanto 16,3 % correspondem a produtos frescos. A maior parte dos produtos confeccionados (57,0%) apresentou concentrações de microrganismos a 30°C iguais ou inferiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g, o que representa um nível satisfatório segundo a tabela de valores guia (tabela 5). Paralelamente, uma percentagem de 23,3% dos produtos confeccionados apresentou concentrações de microrganismos a 30°C entre  $1,0 \times 10^2$  e  $1,0 \times 10^4$  UFC/g, o que representa valores ainda aceitáveis; contudo, uma percentagem de 19,7% (119 produtos) demonstrou valores insatisfatórios, superiores a  $1,0 \times 10^4$  UFC/g, (figura 27).

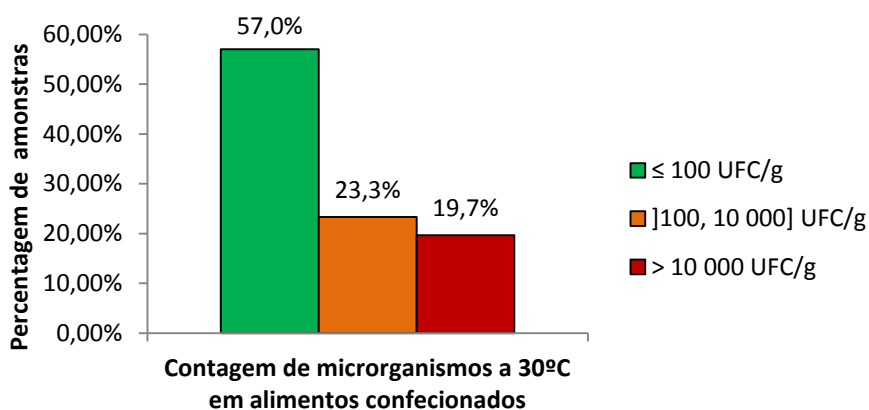


Figura 27 - Concentração de microrganismos a 30°C em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.

Por outro lado, nos produtos não confeccionados, verificou-se que tal como esperado face à bibliografia estudada, a concentração de microrganismos a 30°C é muito superior do que em alimentos que sofreram algum tipo de processamento. Das 118 amostras de produtos frescos, 27,1% apresentaram concentrações superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/g (valores insatisfatórios), enquanto 37,3% dos produtos apresentaram valores aceitáveis, embora não totalmente satisfatórios, entre  $1,0 \times 10^4$  e  $1,0 \times 10^6$  UFC/g. Apenas 35,6% das amostras demonstraram valores satisfatórios, inferiores ou iguais a  $1,0 \times 10^4$  UFC/g, (figura 28).

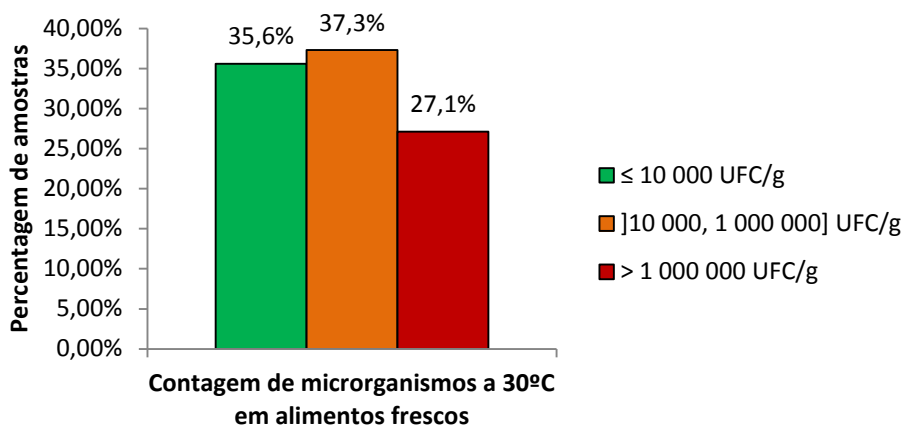


Figura 28 - Concentração de microrganismos a 30°C em alimentos frescos. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.

### *Enterobactérias*

Visto que a tabela dos valores guia (tabela 5) não apresenta limites críticos para a família de bactérias *Enterobacteriaceae* (enterobactérias), foram analisados os resultados como satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios, segundo os mesmos critérios estabelecidos para bactérias coliformes, visto que este último grupo pertence a esta família de bactérias e ambos representam microrganismos indicadores.

As amostras de alimentos confeccionados apresentam-se quase na sua totalidade satisfatórias (88,2%), com concentrações de enterobactérias inferiores ou iguais ao limite de  $1,0 \times 10^1$  UFC/g. Paralelamente, uma pequena percentagem de 3,2% das amostras demonstrou concentrações de enterobactérias entre  $1,0 \times 10^1$  e  $1,0 \times 10^2$  UFC/g, e ainda 8,6% (8 produtos) apresentaram valores insatisfatórios superiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g (figura 29).

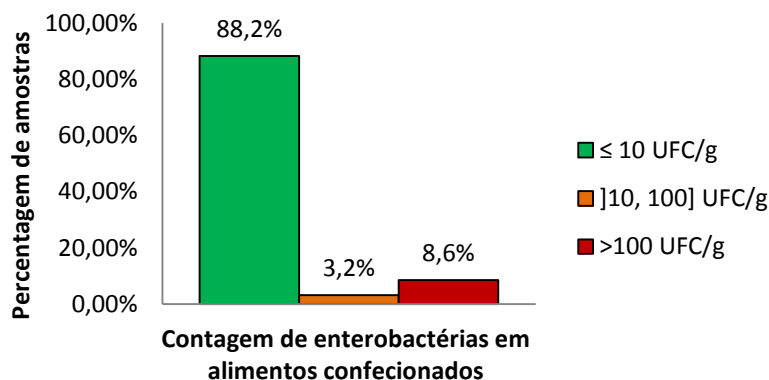


Figura 29 - Concentração de enterobactérias em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.

Relativamente a amostras de produtos frescos, apesar de um maior valor limite de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g, a partir do qual as amostras são consideradas satisfatórias, uma percentagem menor (55,9%) apresentou valores de enterobactérias a este nível, comparativamente aos produtos confeccionados. No entanto, apenas uma percentagem de 5,9% das amostras (2 produtos) revelaram valores insatisfatórios, superiores a  $1,0 \times 10^4$  UFC/g. Ainda, 38,24% demonstraram valores de concentração de enterobactérias aceitáveis, compreendidos entre  $1,0 \times 10^2$  e  $1,0 \times 10^4$  UFC/g (figura 30).

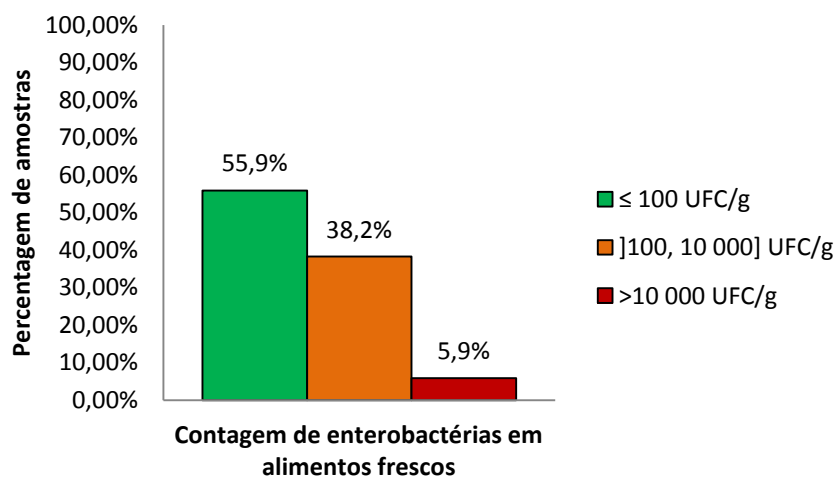


Figura 30 - Concentração de enterobactérias em alimentos frescos. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.

Este grupo de bactérias constitui um indicador muito importante pois desta família fazem parte bactérias patogénicas como *E. coli* e *Salmonella spp.* (12).

### ***Contagem de bactérias coliformes***

O método de contagem de bactérias coliformes foi executado em 315 amostras, 263 das quais representavam alimentos confeccionados e 52 produtos frescos.

A maior parte das amostras de produtos confeccionados ou refeições (84,0%) demonstraram valores satisfatórios de unidades formadoras de colónias de bactérias coliformes, ou seja, valores iguais ou inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g, tendo ainda 3,4% das amostras demonstrado valores ainda aceitáveis compreendidos entre os limites de  $1,0 \times 10^1$  e de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g. Contudo, 12,6 % das amostras revelaram-se insatisfatórias pois apresentaram valores superiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g. No entanto, sabe-se que 6 deste grupo de 33 amostras alimentares insatisfatórias poderão ter contido alimentos frescos (a composição e confeção específica deste produto não está bem especificada e registada). Posto isto, a análise atual é dificultada pois existe uma possibilidade destes produtos pertencerem ao grupo 2 de alimentos de acordo com a tabela 4 (descrita no capítulo introdutório). Um exemplo que poderá ser comentado consiste numa sandes de delícias do mar, em que não está descrito se esta contém alface e, para além disso, é desconhecido o processamento efetuado aquando a preparação das delícias do mar. Se os valores resultantes da análise de bactérias coliformes nestas amostras fossem avaliados de acordo

com os critérios estabelecidos para os alimentos do grupo 2, presentes na tabela 5, estas amostras apresentariam valores ainda aceitáveis visto que para esta categoria de alimentos a concentração a partir da qual as amostras são consideradas insatisfatórias é de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g e não  $1,0 \times 10^2$  UFC/g como para o grupo 1.

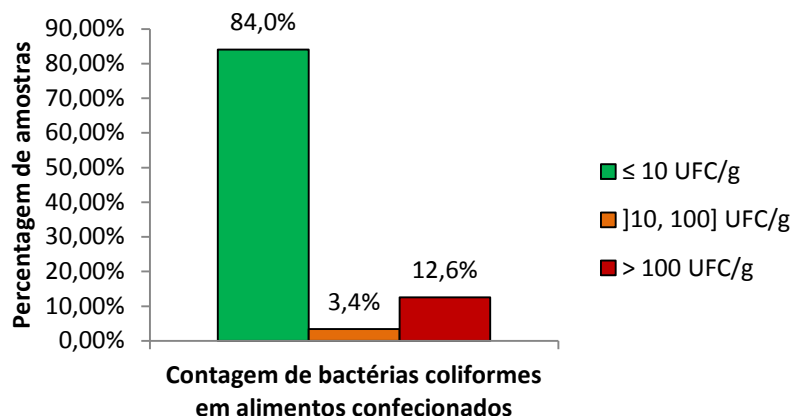


Figura 31 - Concentração de bactérias coliformes em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.

Relativamente aos produtos frescos, apesar do limite satisfatório mais alargado, apenas 55,8% das amostras apresentaram valores satisfatórios, iguais ou inferiores à concentração de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g. Da totalidade de 32 amostras de produtos frescos, 9 apresentaram valores insatisfatórios de bactérias coliformes, em concentrações superiores a  $1,0 \times 10^4$  UFC/g, enquanto 14 apresentaram valores entre  $1,0 \times 10^2$  e  $1,0 \times 10^4$  UFC/g, correspondendo ainda a uma escala aceitável.

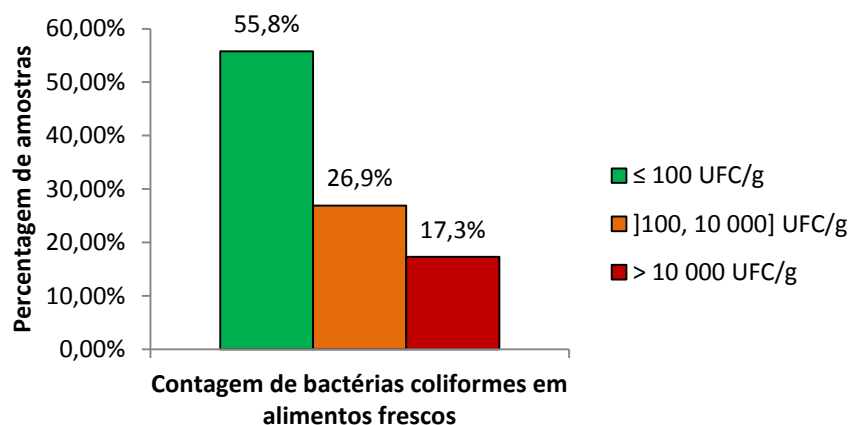


Figura 32 - Concentração de bactérias coliformes em alimentos frescos. Percentagem de amostras entre os diferentes limites críticos de concentração.

### ***Contagem de E. coli $\beta$ -glucuronidase positiva***

Relativamente ao ensaio de enumeração de bactérias *E. coli*,  $\beta$ -glucuronidase positiva em alimentos, os resultados que se seguem não incluem os resultados obtidos da

análise de amostras de carne picada providas dos 22 talhos participantes no caso particular deste estudo.

Do conjunto destas amostras, 432 dizem respeito a alimentos confeccionados, enquanto apenas 86 são respetivas a produtos frescos. Os resultados das amostras de produtos confeccionados revelaram-se quase na sua totalidade (99,3%) isentos da bactéria, ou seja, valores inferiores ao limite de deteção do método de ensaio (inferior a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g). Apenas uma percentagem de 0,7% das amostras confeccionadas (3 amostras) apresentaram valores de *E. coli* superiores ou iguais a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g, sendo estes valores insatisfatórios segundo a tabela de valores guia (figura 33).

Apesar de a confeção e/ou ingredientes implícitos em 17 dos produtos confeccionados não estarem bem definidos, pondo em causa o grupo de alimentos ao qual estes grupos pertencem (tendo em conta a tabela 4), nenhum deles apresentou valores insatisfatórios.

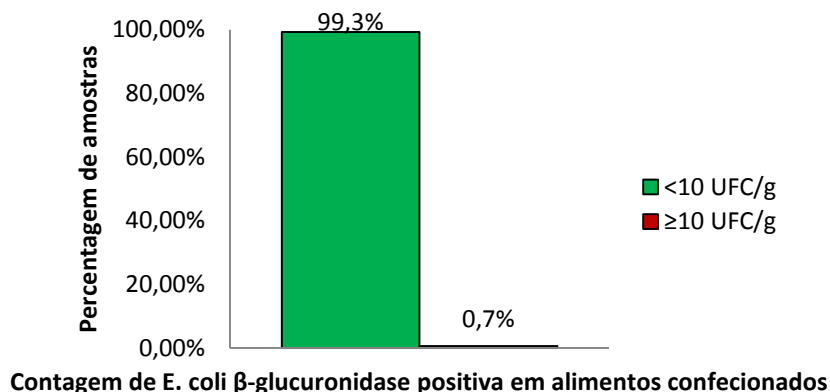


Figura 33 - Concentração de *E. coli* β-glucuronidase positiva em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras nos intervalos de valores considerados satisfatórios e insatisfatórios.

Relativamente aos produtos frescos, 93,0% das amostras apresentaram resultados satisfatórios, enquanto 7,0% apresentaram valores insatisfatórios de *E. coli*, ou seja, superiores ou iguais a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g (figura 34).

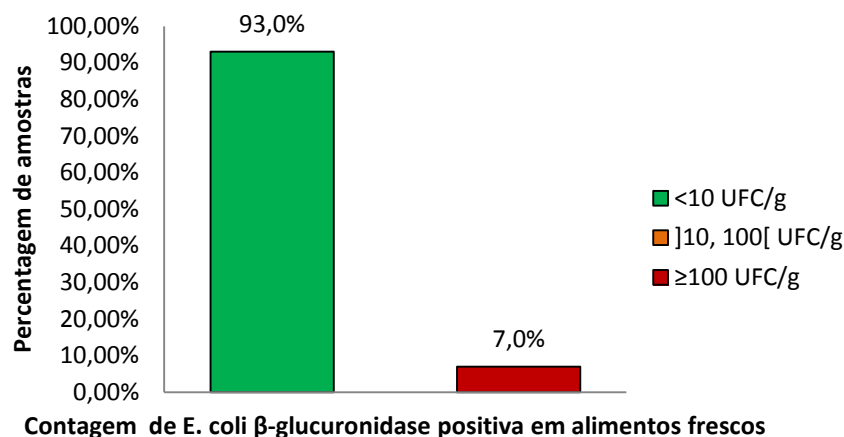


Figura 34 - Concentração de *E. coli* β-glucuronidase positiva em alimentos frescos. Percentagem de amostras nos intervalos de valores considerados satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios.

Dentro deste grupo de 518 amostras, às quais foi executado o método de contagem de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, 68 representam produtos frescos ainda não prontos a consumir, como carne fresca (43 produtos), peixe fresco, entre outros. Apesar deste tipo de produtos não pertencer à tabela 4 que apenas engloba produtos prontos a consumir, estes foram analisados também tendo em conta os valores guia considerados para os produtos de grupo 3, relativos a alimentos não confeccionados como saladas, frutas e vegetais, pois não existe outra regulamentação específica para estes produtos.

Os grupos de microrganismos até agora apresentados (microrganismos a 30°C, enterobactérias, bactérias coliformes e *E. coli*), representam microrganismos indicadores que, de modo geral, acusam a ocorrência de procedimentos de higiene pouco adequados, má confeção, ou uma contaminação pós-preparação, quando certos níveis são detetados nos alimentos. Esta contaminação pode acontecer devido a manipuladores, equipamento sujo ou embalagem e exposição ao ambiente (23).

Apesar de algumas estirpes de *E. coli* serem patogénicas, esta bactéria é enumerada segundo este método como um microrganismo indicador, sendo esta o indicar de contaminação fecal mais fiável. A contagem de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, juntamente com os ensaios anteriores de enumeração de microrganismos a 30°C, enterobactérias e bactérias coliformes, são indicativos de qualidade e frescura do produto em análise (26, 27). Posto isto, verifica-se que a maioria dos produtos avaliados neste estágio apresentou frescura e qualidade satisfatória (ou aceitável). Para além disso, é importante salientar que apesar da presença de níveis elevados destas bactérias em alguns alimentos não expor um risco de saúde direto ao consumidor, esta pode ser indicativa da presença de organismos patogénicos (ou estirpes patogénicas, no caso de *E. coli*).

### ***Contagem de Estafilococos coagulase-positiva***

O método de contagem de estafilococos coagulase positiva foi executado em 813 amostras no período de estudo considerado. Nenhuma destas amostras, tanto de produtos frescos como alimentos confeccionados, apresentou valores insatisfatórios de estafilococos, segundo os limites críticos inseridos na tabela de valores guia (tabela 5). Apenas uma percentagem de 5,4% do total das amostras (44 produtos), correspondentes a queijos frescos de cabra e de vaca, apresentaram valores de UFC/g entre  $1,0 \times 10^2$  e  $1,0 \times 10^4$ , os quais são aceitáveis, apesar de não serem totalmente satisfatórios. Desta forma, 80,0% dos produtos frescos e a totalidade dos produtos confeccionados apresentaram-se satisfatórios, com valores inferiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC de estafilococos coagulase positiva por grama de amostra (figura 35).

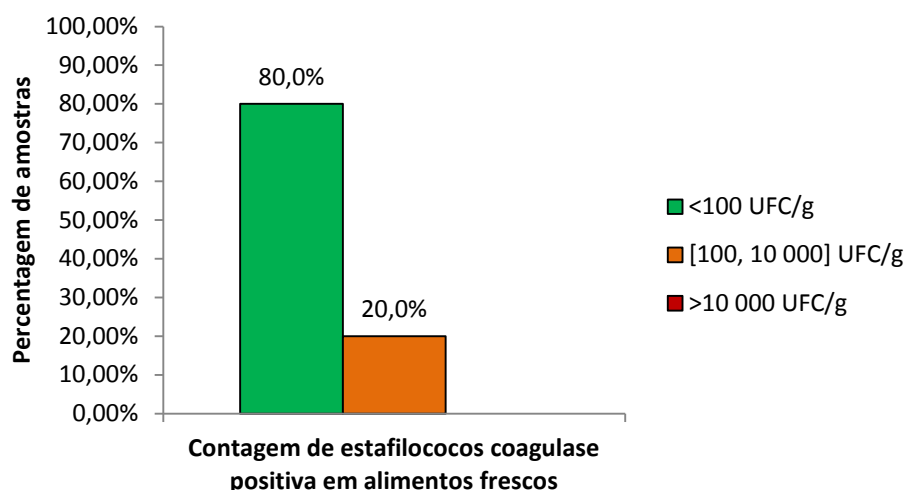


Figura 35 - Concentração de estafilococos coagulase positiva em alimentos confeccionados. Percentagem de amostras nos intervalos de valores considerados satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios.

#### **Contagem *Listeria monocytogenes*.**

O ensaio de contagem de *Listeria monocytogenes* foi executado apenas em 44 amostras, no período entre Agosto de 2011 e Janeiro de 2013. Todas estas amostras representativas de alimentos confeccionados apresentaram resultados satisfatórios, inferiores ao limite de detecção de  $1,0 \times 10^1$  UFC/g.

#### **4.2.2. Pesquisa de microrganismos em alimentos frescos e processados**

##### ***Pesquisa de esporos de Clostridium sulfito-redutores***

Relativamente à pesquisa de esporos, apenas 52,4% das amostras de alimentos frescos se apresentaram negativas quanto à presença de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em 1g de amostra, enquanto 29,6% apresentaram-se positivas em 1g de amostra (e negativas em  $10^{-1}$ g). Ainda, 19,1% das amostras revelaram a presença de esporos deste patogénico numa diluição maior da amostra:  $10^{-1}$ g (figura 36).

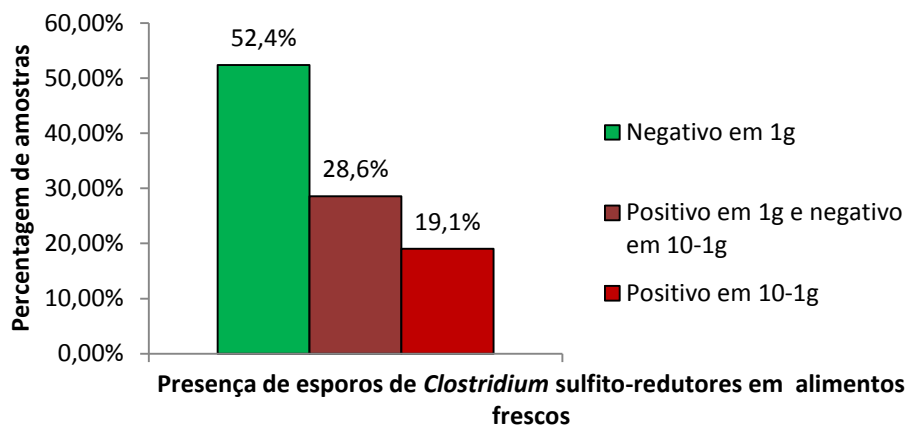


Figura 36 - Percentagem de amostras com presença/ausência de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em alimentos frescos.

Relativamente aos produtos confeccionados, uma menor percentagem de amostras apresentou valores positivos, demonstrando-se a presença de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em apenas 7,4% e 6,0%, respetivamente, em 1g e em 10<sup>-1</sup>g da amostra. A percentagem total de resultados negativos é de 86,6% (figura 37).

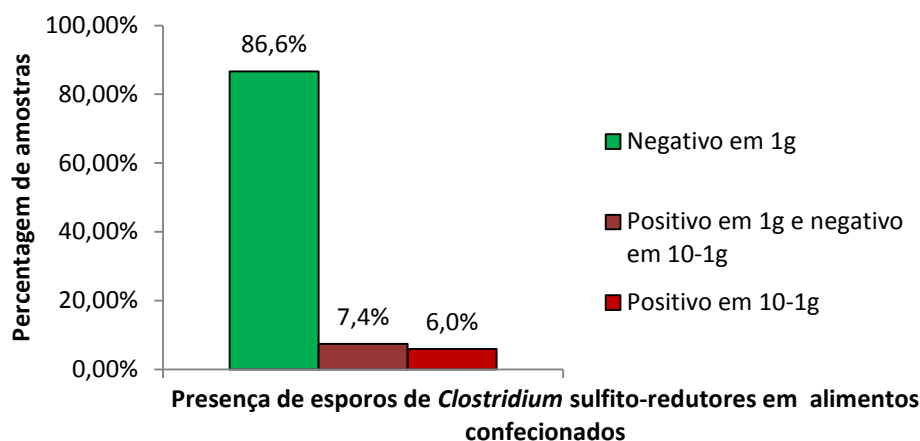


Figura 37 - Percentagem de amostras com presença/ausência de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em alimentos confeccionados.

O grupo de *Clostridium* sulfito-redutores é composto maioritariamente por *Clostridium perfringens*. Estas bactérias patogénicas estão largamente distribuídos no ambiente pois são capazes de formar esporos que sobrevivem a condições muito adversas e, desta forma, podem ter várias origens (122). No presente estudo foram detetados esporos destas bactérias inclusive em 10<sup>-1</sup>g de amostras de croissants de ovo e de chocolate congelados. A intoxicação alimentar causada por *Clostridium*, principalmente *C. perfringens* é muitas vezes associada a alimentos cozinhados, pois mesmo quando a temperatura de confeção dos alimentos elimina as células vegetativas, os esporos não são eliminados. Estes, mais tarde podem germinar e então multiplicar-se no produto (123). Durante o período em estudo, no laboratório YourLAB S. A., também foi detetada a presença de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em 1 g e 10<sup>-1</sup>g de amostras de alimentos confeccionados e processados, respetivamente, num pastel bola de Berlim e em frango estufado com batata cozida e legumes.

A pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito redutores, consiste num método padrão bastante antigo (1986) e apesar disso, não existe legislação específica, ou valores guia para a presença destes microrganismos em alimentos. Contudo, visto que as bactérias *Clostridium* são muito patogénicas, a presença dos esporos, em qualquer uma das diluições da amostra, podem representar uma ameaça ao consumidor (12).

### **Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Relativamente à pesquisa de *Listeria monocytogenes*, foram analisadas um total de 399 amostras, sendo 229 alimentos confeccionados e 170 alimentos frescos. A totalidade das amostras demonstrou-se ausente desta bactéria patogénica.



### **Pesquisa de *Salmonella* spp.**

No período em estudo, num total de 727 alimentos analisados relativamente à presença da bactéria *Salmonella* spp., dos quais 225 pertenciam à categoria de alimentos frescos, não foi encontrada esta bactéria patogénica, com exceção de uma amostra respetiva a um requeijão (correspondente a 0,1% dos produtos) identificada em Janeiro de 2013 (figura 38).

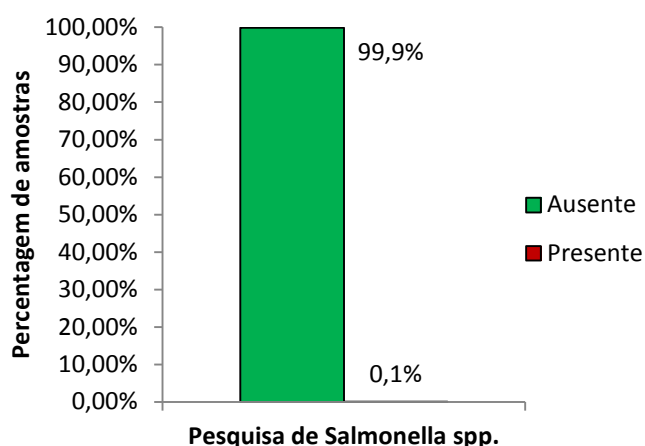


Figura 38 - Percentagem de amostras com presença/ausência de *Salmonella* spp.

A ocorrência de *Salmonella* spp. nesta amostra é preocupante pois esta bactéria é extremamente patogénica podendo provocar a doença febre de tifoide ou salmonelose e, devido à longevidade do método de deteção desta bactéria, não foi possível evitar o consumo do produto. Depois de detetada segundo o método padronizado já referido anteriormente, a presença da bactéria *Salmonella* spp. foi confirmada apenas após 5 dias da recolha do requeijão, utilizando o *kit* de teste API 20 E. O API 20 E é um método de identificação das *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas que utiliza *strips* miniaturizados com 20 compartimentos que produzem reações bioquímicas. Através das reações a identificação pode ser feita de acordo com uma tabela ou quadro de leitura, ou ainda utilizando um programa informático de identificação (124).

Outros estudos indicaram também a presença desta bactéria, *Salmonella* spp., em produtos lácteos, mais especificamente em queijos produzidos com leite não pasteurizado (125). Visto que o leite pode contrair a bactéria a partir do animal de origem aquando a colheita, a presença de *Salmonella* spp. nesta amostra de requeijão provavelmente terá sido devida a um processamento inadequado do produto, incluindo a utilização de leite não pasteurizado. Por vezes a presença desta bactéria também pode indicar uma pobre higienização, ou seja, a bactéria *Salmonella* spp. pode ter ocorrido no leite e/ou requeijão devido uma contaminação cruzada, através do manipulador e/ou equipamento (2, 126).

De modo geral, tanto os ensaios de contagem de microrganismos indicadores como os ensaios de contagem e pesquisa de microrganismos patogénicos ou de esporos, apresentaram resultados insatisfatórios com maior frequência em alimentos frescos do que

os alimentos confeccionados, como era esperado. Os alimentos confeccionados, ao sofrerem um ou vários procedimentos de confeção diminuem ou eliminam a carga microbiana possivelmente existente no alimento (8). Independentemente do processamento, a maioria dos produtos apresentou-se ausente de microrganismos patogénicos, ou com concentrações de microrganismos dentro dos intervalos de valores considerados satisfatórios ou aceitáveis.

Alguns dos resultados das amostras alimentares analisadas no laboratório *YourLAB S. A.* nos 20 meses considerados, podem ser comparados com resultados obtidos de um estudo realizado no Reino Unido entre 2003 e 2005, em que verificaram a qualidade microbiológica de algumas amostras de produtos alimentares confeccionados, prontos a consumir, tais como *sandwiches* (sem alface), bolos, patês, molhos, entre outros, utilizando, os mesmos limites de aceitabilidade que o presente estudo. Dos 3391 produtos analisados ao longo de dois anos, no Reino Unido, apenas 7,6% dos produtos apresentaram concentrações de microrganismos a 30°C em valores insatisfatórios, enquanto no presente estudo foram verificadas insatisfatórias 19,7% das amostras confeccionadas. Apenas 8 produtos (0,2%) apresentaram concentrações insatisfatórias de *E. coli*, valor este semelhante a 0,7% de amostras insatisfatórias analisadas no laboratório *YourLAB S.A.*. Quanto à presença de *Staphylococcus aureus*, foi verificada a ocorrência de 9 amostras insatisfatórias (com concentrações de *S. aureus* entre  $1,0 \times 10^2$  e  $<1,0 \times 10^4$  UFC/g, sendo consideradas inaceitáveis amostras com concentrações  $\geq 1,0 \times 10^4$  UFC/g), enquanto no presente estudo não existem registos de amostras com concentrações de bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva (categoria na qual se inserem bactérias *S. aureus*) superiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g. Das 3391 amostras analisadas, não foi detetada a presença de *Salmonella spp.*, enquanto no presente estudo foi verificada a presença desta bactéria patogénica em 25g de uma amostra de requeijão. Contudo, enquanto a bactéria *Listeria monocytogenes* foi considerada ausente em todas as amostras analisadas no laboratório *YourLAB S.A.*, no Reino Unido foi detetada a presença desta bactéria patogénica, em três produtos: paté de carne e duas *sandwiches* de maionese e ovo (127).

## 5. Conclusões

Relativamente à primeira parte deste trabalho de dissertação, no período de julho de 2011 a fevereiro de 2013, as análises mensais às amostras de carne picada nos 22 estabelecimentos revelaram uma percentagem média de 25% de resultados em não-conformidade relativamente ao ensaio de enumeração da bactéria *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, indicadora de contaminação fecal. Visto que os talhantes são informados mensalmente acerca da qualidade da carne picada relativamente à presença de *E. coli*, seria de esperar uma diminuição do número de contaminações ao longo dos meses considerados neste estudo. Contudo, tal não foi verificado nos estabelecimentos em estudo, com a exceção de dois dos talhos. Para além disso, em dois dos estabelecimentos foi verificado um número máximo de 9 não-conformidades das amostras, no período considerado, enquanto apenas um, num total de 22, apresentou nenhum resultado insatisfatório no que

diz respeito à enumeração de *E. coli* nas amostras de carne picada. Tal facto é indicativo de que alguns dos talhos deveriam verificar a qualidade dos seus fornecedores e/ou reforçar os cuidados na manipulação das carnes, nomeadamente a utilização da máquina de moagem o mais limpa possível e a temperaturas adequadas, e também a exposição da carne a temperaturas inferiores a 5°C aproximadamente. Para aprofundamento deste estudo, e obtenção de mais conclusões, seria interessante saber quais os fornecedores de cada um dos estabelecimentos, avaliar também os níveis de *E. coli* nas carcaças antes de saírem do matadouro e aquando a receção nos talhos, comparando posteriormente estes resultados com os valores de *E. coli* nas amostras da mesma carne após moagem.

A maioria dos resultados provenientes da análise de zaragatoas que revelaram má higienização de superfícies e/ou de manipuladores não são coincidentes com valores de concentrações de *E. coli* nas amostras de carne picada em não-conformidade de acordo com a Portaria 699:2008. Esta verificação leva a concluir que um elevado número de unidades formadoras de colónias desta bactéria nestas amostras deve-se principalmente a processos anteriores à chegada das carnes aos talhos. Visto que esta bactéria é originária do sistema gastrointestinal dos animais, vários aspetos associados com a higienização aquando o processo de abate dos animais, processamento e lavagem das carcaças, podem estar associados à presença e crescimento desta bactéria na carne. Também, a ocorrência de temperaturas inadequadas durante o armazenamento e transporte da carne podem ter influência.

Tendo em conta que em alguns dos talhos foram verificadas algumas práticas inadequadas de higienização de superfícies e dos próprios manipuladores (mãos), pode-se supor que alguns dos manipuladores não tenham formação suficiente a nível de Segurança e Higiene no Trabalho e Boas Práticas na Indústria Alimentar, tal como verificado por um estudo realizado em 2011 relativamente à formação de manipuladores em talhos de Portugal.

Numa segunda parte do trabalho, relativamente aos ensaios de pesquisa e enumeração de microrganismos patogénicos realizados em outros alimentos, no laboratório YourLAB S. A., a presença da bactéria *Listeria monocytogenes* não foi detetada em nenhuma das amostras analisadas no período de tempo considerado. Também, não foram detetados valores inaceitáveis de concentração de bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva, num total de 813 ensaios. Contudo, foi detetada a presença de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em 75 de um total de 399 amostras analisadas, assim como foi detetada e confirmada a presença de *Salmonella spp.* numa amostra de requeijão (de um total de 727 amostras). Este último foi o caso mais problemático pois a bactéria *Salmonella spp.* foi apenas confirmada após 5 dias da recolha da amostra, o que não possibilitou avisar o produtor atempadamente de forma a evitar o consumo do produto, o qual poderá ter provocado a doença de salmonelose no consumidor, ou ainda febre de tifoide, tendo em conta a bibliografia estudada.

Os ensaios de enumeração de microrganismos indicadores (microrganismos a 30°C, enterobactérias, bactérias coliformes e *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva) revelaram resultados aceitáveis na maioria das análises, contudo, algumas amostras demonstraram-se não-conformes relativamente aos valores guia publicados pelo Instituto Nacional de Saúde de Dr. Ricardo Jorge. A maior percentagem de resultados insatisfatórios foi verificada nos ensaios de contagem de microrganismos a 30°C e contagem de bactérias coliformes. De um total de 723 amostras, 151 demonstraram-se não-conformes relativamente aos valores de concentração de microrganismos a 30°C detetados, enquanto as bactérias coliformes relevaram-se em concentrações insatisfatórias em 42 de 315 amostras às quais foi executado o ensaio de enumeração deste grupo de bactérias no período considerado.

Os resultados insatisfatórios relativos aos ensaios de enumeração e pesquisa de microrganismos em produtos alimentares revelaram que alguns manipuladores podem não ter realizado boas práticas de higiene aquando a preparação/manipulação dos alimentos. Os manipuladores podem não ter lavado e/ou confeccionado o produto corretamente, podem ter provocado uma contaminação no alimento pós-confeção devido a uma higienização inadequada nomeadamente aquando a lavagem de mãos e utensílios e, para além disso, podem ter exposto os produtos/refeições a temperaturas inadequadas. Adicionalmente, os manipuladores dos estabelecimentos incluídos neste estudo podem ter falta de formação acerca de boas práticas na manipulação de alimentos, nomeadamente nas áreas de Segurança e Higiene no Trabalho e Boas Práticas na Indústria Alimentar.

## 6. Referências

1. Food Safety. World Health Organization; 2010 (acedido em 12 Janeiro 2013), disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/>.
2. Cowan, M. K. (2012) *Microbiology A Systems Approach*. 3th ed. New York: McGraw-Hill. 180-682.
3. Souza, E.L., Silva, C.A., Souza, C.P. (2002). Qualidade Sanitária de Equipamentos, Superfícies, água e mãos de manipuladores de alguns estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de João Pessoa. *PB Higiene Alimentar*. 18 (116): 98–102.
4. Veiga, A.A.I., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S. (2009). Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*. 33-37.
5. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2010). Microbiology - An Introduction, *Benjamin Cummings 10th ed.* 280-751
6. Miles, A. A., Niven, J. S. F. (1949). The enhancement of infection during shock produced by bacterial toxins and other agents. *Nation Institute for Medical Research, London, N. W.* 7. 73-95.
7. Gould, L.H. (2011) Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2008. *Centers for Disease Control and Prevention*, (acedido em 12 Janeiro 2013), disponível em [http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s\\_cid=mm6035a3\\_w](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w).
8. Olaimat, A.N., Holley, R.A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*. 32(1): 1-19.
9. Pereira, M.L., Do Carmo, L. S., Dos Santos, E. J., Pereira, J. L., Bergdoll, M.S. (1996). Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *Journal of Food Protection*. 59: 559–561.

10. The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007 (2009). *The EFSA Journal*. 271.
11. Zhao, W., Lin, H., Qian, L., Gu, X., Dong, S., Wang L. (1995). Study on an outbreak of type E botulism. *Chin. J. Health Lab. Techno.* 5: 62–63.
12. Jr., M.J.P., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. (1990). Microbiologia - Conceitos e Aplicações. 2nd ed. *Makron Books*. 225-230.
13. European Centre for Disease Prevention and Control (2011). Suveillance Report. Annual Epidemiological report, Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. 63-104.
14. Saraiva M., Campos Cunha I., Costa Bonito C., Pena C., Toscano M. M., Teixeira Lopes T., et al. (2012). First case of infant botulism in Portugal. *Food Control*. 26(1): 79-80.
15. Doyle, B. M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds.) (2001). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers (2nd ed.), *ASM Press, Washington, DC*. 337–352.
16. Junttila, J. R., Niemala, S. I., and Hirn, J. (1988). Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 321-327.
17. Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48: 3996–4000.
18. Franco, D. A. (1988). *Campylobacter* species: considerations for controlling a foodborne pathogen. *Journal of Food Protection*. 51: 145–153.
19. Entis P. (2012). More Than 1,000 Ill in Dutch Salmonella Outbreak. Food Safety News (acedido em 5 Janeiro 2013), disponível em: <http://www.foodsafetynews.com/2012/10/more-than-1000-ill-in-dutch-salmonella-outbreak/#.UQg0tL-Tp3F>.
20. Herriman R. Norway (2012). ‘Christmas Party’ E.Coli Outbreak Declared Over. The Global Dispatch; (acedido em 5 Janeiro 2013), disponível em: <http://www.theglobaldispatch.com/norway-christmas-party-e-coli-outbreak-declared-over-54738/>.
21. Evira (2012). *Listeria* in the the city of Vaasa and Eastern Finland – source of the outbreak is under investigation. New Food; (acedido em 5 Janeiro 2013), disponível em: [http://www.newfoodmagazine.com/8522/news/listeria-in-the-city-of-vaasa-and-eastern-finland-source-of-the-outbreak-is-under-investigation/?utm\\_medium=twitter&utm\\_source=twitterfeed](http://www.newfoodmagazine.com/8522/news/listeria-in-the-city-of-vaasa-and-eastern-finland-source-of-the-outbreak-is-under-investigation/?utm_medium=twitter&utm_source=twitterfeed).
22. Scott, T., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., Lukasik, J., (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5796–5803.
23. Moss and D.A.A. (1982). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie van Leeuwenhuek*. 48: 609-611.
24. Oliveira, A. M., Gonçalves, A. M., Shinohara, N. K. S., Stamford, T. L. M. (2003). Manipuladores de Alimentos: Um fator de risco Higiene Alimentar. 17: 114–115.
25. Geldreich, E. E. (1966). Sanitary significance of fecal coliform in the environment. U.S. Dept. of the Interior. Cincinnati, Ohio. Water Pollution Control Research Series Publication, WP-20–3. *Federal Water Pollution Control Administration*.
26. Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M., Palmer, C. J.. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1165–1172.
27. Foulquié Moreno, M.R., et al. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106(1): 1-24
28. Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. (1986). Microbiology. 5th ed. Singapore: McGraw-Hill. 107-112.
29. Van Derlinden, E., Boons, K., Van, I. J. F. (2011). *Escherichia coli* population heterogeneity: Subpopulation dynamics at super-optimal temperatures. *Food Microbiology*. 28(4): 667-677.

30. Sutherland, J. P., Bayliss, A. J., Roberts, T. A. (1994). Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*. 21(3): 217-236.
31. Galdiero, E., D'Isanto, M., Aliberti, F. (1997). Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Research in Microbiology*. 148(4): 305-315.
32. López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., et. al. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*. 96(3): 289-300;
33. Ferrer, J., Prats, C., López, D., et. al. (2009). Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 134(1-2): 2-8.
34. Huang, L. (2013). Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. *Food Control*. 32(1): 283-338.
35. NP EN ISO 22000:2005 (2005). Sistemas de gestão da segurança alimentar - Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar, *Instituto Português da Qualidade*.
36. Regulamento (CE) N.º 178/2002 (2002). Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L31/1.
37. Ministério da Saúde - Decreto-Lei n.º 113/2011 (2011). *Diário da República*.
38. IFS - International Food Standard (2009). *QMI – Sai Global*.
39. Global Food Safety Resource Inc. (2013). (acedido em 2 janeiro 2013), disponível em: <http://www.globalfoodsafetyresource.com/global-food-standard-brc.html>.
40. Queiroz P. (2006). Noções gerais, Regulamentação, Certificação. *Segurança e Qualidade Alimentar*. 33-35.
41. Silva R. (2007). Legislação e Normalização. *Segurança e Qualidade Alimentar*. 60-61.
42. Regulamento (CE) N.º 852/2004 (2004). Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139/1.
43. Regulamento (CE) N.º 853/2004 (2004). Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139/55.
44. Reis, J. (2007). Actividade da ASAE e e Aplicação do Regulamento (CE) N.º 852/2004. *Segurança e Qualidade Alimentar*. 51-53.
45. Santos M. I., Correia C., Cunha M. I., Saraiva M. M., Novais M. R. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA); Centro de Segurança Alimentar e Nutrição (CSAN)*. 66-68.
46. NP EN ISO/IEC 17025:2005. (2005). Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
47. Acreditação de Laboratórios de Ensaio Microbiológicos. (2007). *Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal*.
48. ISO 7218 (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. *International Standard Organization*.
49. Escherich, T. (1988). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Rev. Infect. Dis.* 10: 1220-1225.
50. Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S., Gonzalez, R. (2008). Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*. 1124-1135.
51. Hartman, P.A. (1989). The MUG (glucuronidase) test for *Escherichia coli* in food and water. In: Turano A. (Ed.), *Rapid Methods and Automation in Microbiology and immunology*, Brixia Academic Press, Brescia, Italy. 290-308.
52. Buehler, H. J., Katzman, P. A. and Doisy, E. A. (1951). Studies on P-glucuronidase from *E. coli*. *Proc. Sot. Exp. Biol. Med.* 16: 672-676.

53. Meng, J.; Feng, P.; Doyle, M.P. (2001) Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, F.P.; Ito, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods. 4 ed.*, Washington: APHA, 35, 331-341.
54. Raetz, C. R. H., Dowhan, W. (1990). Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265:1235-1238.
55. Ewing, W. H., Tatum, R. W., Davis, B. R., Reavis, R. W., (1974) Studies on the serology of the *Escherichia coli* group, CDC Publication, Communicable Disease Center, Atlanta, Ga., 3, 1956.
56. Brenner, D.J., Fanning, G.R., Skerman, F.J., Falkow, S., (1972). Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J. Bacteriol.* 109: 953–965.
57. Eisenstein, Barry and Zaleznik, Dori, (2000). Enterobacteriaceae in Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and Practice of infectious Diseases, Fifth Edition. 206: 2294-2310.
58. Ørskov, F., Ørskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Canadian Journal of Microbiology.* 38(7): 699-704.
59. Frank, M. Faber, M. Askar, H. Bernard, A. Fruth, A. Gilsdorf, M. Hohle, H. Karch, G. Krause, R. Prager, A. Spode, K. Stark, D. Werber (2011). Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011 Euro Surveillance. 16.
60. Balagué, C., et al. (2006). Occurrence of non-O157 *shiga* toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. *Food Microbiology.* 23(3): 307-313.
61. Allerberger, F., et al. (2003). Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *International Journal of Infectious Diseases.* 7(1): 42-45.
62. Caro, I., et al., (2011). Occurrence of *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in raw ewe's milk and performance of two enrichment broths and two plating media used for its assessment. *International Journal of Food Microbiology.* 146(1): 84-87.
63. Klein, G. and Bülte, M., (2003). Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces. *Food Microbiology,* 20(1): 27-33.
64. Murphy, M., et al. (2007). Development and assessment of a rapid method to detect *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in retail minced beef. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 210(2): 155-161.
65. Rodríguez-Caturla, M.Y., et al. (2012). Development of a risk-based methodology for estimating survival and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* on iceberg-lettuce exposed at short-term storage in foodservice centers. *Journal of Microbiological Methods.* 90(3): 273-279.
66. Sánchez, S., et al. (2012). Subtilase cytotoxin encoding genes are present in human, sheep and deer intimin-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O128:H2. *Veterinary Microbiology,* 159(3–4): 531-535.
67. Aidar-Ugrinovich, L., et al. (2007). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology.* 115(3): 297-306.
68. Oliveira, M. G., et al. (2008). Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *International Journal of Food Microbiology.* 127(1–2): 139-146.
69. Jo, M.-Y., et al. (2004). Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *International Journal of Food Microbiology.* 95(1): 41-49.
70. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McCee, H. B., Wells, J. G., Davies, B. R., Herbert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine.* 308: 681–685.

71. Stampi, S., et al. (2004). Detection of *Escherichia coli* O157 in bovine meat products in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 90(3): 257-262.
72. Gould LH. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2008 (2011). *Centers for Disease Control and Prevention*. (acedido em 12 Janeiro 2013), disponível em: [http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s\\_cid=mm6035a3\\_w](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w).
73. Aslam M., Nattress F., Greer G., Yost C., Gill C., McMullen L. (2003). Origin of Contamination and Genetic Diversity of *Escherichia coli* in Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5): 2794-2799.
74. Castonguay, M. H., van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., van der Meer, W., Harmsen, H., Landini, P. (2006). Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Research in Microbiology*. 157: 471-478.
75. Roberts, D. (1990). Sources of infection: food. *Lancet (British edition)*. 336: 859-861.
76. Varnam, A. H., Sutherland, J. P., (1985). Meat and meat products. Modelling of microbial Technology, Chemistry and Microbiology, Chapman and Hall, growth in refrigerated packaged beef. *J. Food Sci.* 50, 1003- UK. 98-386.
77. Grau, F. H. (1981). Role of pH, lactate, and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative gram-negative bacteria on beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1043-1050.
78. Hui, Y. H. (2006). Food Biochemistry and Food Processing. Cap. 13 Biochemistry of Raw Meat and Poultry, *First ed.: Blackwell Publishing*. 295.
79. Buchanan, R. L. and Bagi, L.K. (1997). Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 14(5): 413-423.
80. Scanga, J. A. , Grona, A. D., Belk, K. E., et. al. (2000). Microbiological contamination of raw beef trimmings and ground beef. *Meat Science*. 56(2): 145-52.
81. Mann, J. E., Brashears, M. M. (2006). Validation of time and temperature values as critical limits for the control of *Escherichia coli* O157:H7 during the production of fresh ground beef. *Journal of Food Protection*. 69 (8): 1978-1982.
82. Juck, G., Neetoo, H., Beswick, E., Chen, H. (2012). Influence of prior growth conditions, pressure treatment parameters, and recovery conditions on the inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella Typhimurium* in turkey meat. *International Journal of Food Microbiology*. 153(1-2): 203-211.
83. Vold, L., Holck, A., Wasteson, Y., Nissen H. (2000). High levels of background flora inhibits growth o *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*. 56(2-3): 219-225.
84. Strachan, N. J. C., Doyle, M. P., Kasuga, F., Rotariu, O., Ogden, I. D. (2005). Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*. 103: 35-47.
85. Levy, S.B. (1998). The Challenge of Antibiotic Resistance. *Scientific American Mar.* 32-39.
86. Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 18(4): 353-358.
87. Bettelheim, K. A., Hornitzky, M. A., Djordjevic, S. P., Kuzevski, A. (2003). Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) and non- VTEC isolated from domestic animals and humans. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 155-162.
88. Ministérios da Economia e da Inovação e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Portaria n.º 699/2008. (2008). Diário da República, 1ª série - N.º 145.
89. Regulamento (CE) N.º 2073/2005. (2005). *Jornal Oficial da União Europeia*, L338/I.
90. ISO 16649-2:2001. (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidasepositive. *Escherichia coli*. *First ed.*. 1-16.

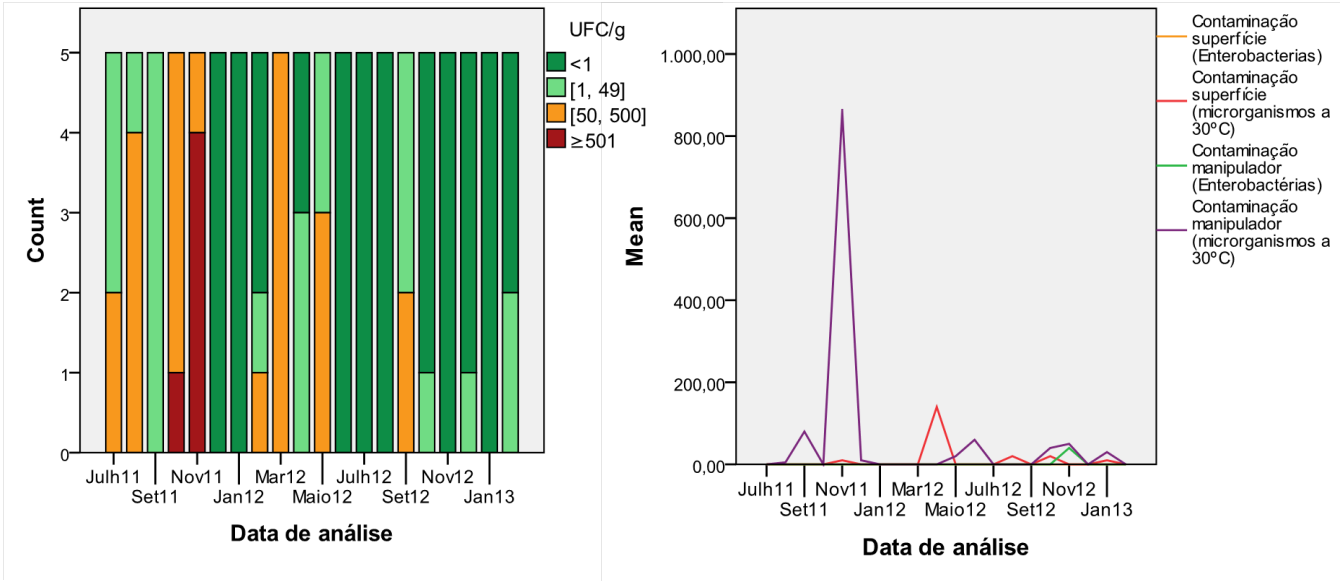


91. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E. (1999). Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(7): 599-624.
92. Boer, E., Beumer, R. R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50(1-2): 119-30.
93. Baldwin, T. O. (1996). Firefly luciferase: The structure is known, but the mystery remains. *Structure*. 4(3): 223-228.
94. Brett, M. M. (1998). Kits for the detection of some food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.*. 110S-118S.
95. Cao, Y., Kimura, S., et. al. (2012). Fluorescence in situ hybridization using bacterial artificial chromosome (BAC) clones for the analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cells. *Methods*. 56(3): 418-423.
96. Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction in food microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. 23(1): 89-103.
97. Jensen, M., Webster, J. A., Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945-952.
98. Iqbal, S. S., Mayo, M.W., Bruno, J. G., Bronk, B. V., Batt, C. A. (2000). Chambers JP. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 15(11-12): 549-578.
99. Klein, G., Bülte, M. (2003). Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic E. coli-associated virulence factors from food and animal faeces. *Food Microbiology*. 20(1): 27-33..
100. Wang, Q., Ruan, X., Wei, D., Hu, Z., Wu, L., Yu, T., et al. (2010). Development of a serogroup-specific multiplex PCR assay to detect a set of *Escherichia coli* serogroups based on the identification of their O-antigen gene clusters. *Molecular and Cellular Probes*. 24(5): 286-90.
101. Kawasaki, S., Fratamico, P. M., Horikoshi, N., Oka, Y., Takeshita, K., Sameshima T., et al. (2010). Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection and Quantification of *Salmonella* Species, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Pork Samples. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7(5): 549-554.
102. Kostrzynska, M., Bachand, A. (2006). Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can. J. Microbiol.* 52: 1-8.
103. Bakel, H. V., Holstege, F. P. (2008). A Tutorial for DNA Microarray Expression Profiling. *Elsevier Inc.* 22-28.
104. Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*. 27(6): 710-730.
105. Torlak, E., Akan, I. M., Gokmen, M. (2008). Comparison of TEMPO (R) EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 566-570.
106. Jackson, R.W., Osborne, K., Barnes, G., Jolliff, C., Zamani, D., Roll, B., Stillings, A., Herzog, D., Cannon, S., Loveland, S. (2000). Multiregional evaluation of the SimPlate heterotrophic plate count method compared to the standard plate count agar pour plate method in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 453,454.
107. Manafi, M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*. 60(2-3): 205-218.
108. Kumar, V. S., Nagaraja, B.M., Shashikala, V., Padmasri, A. H., Madhavendra, S. S., Raju, B.D., et al. (2004). Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 223(1-2): 313-319.
109. Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. (2005). Food Microbiology and Laboratory Practice, *Blackwell Publishing, Iowa USA*

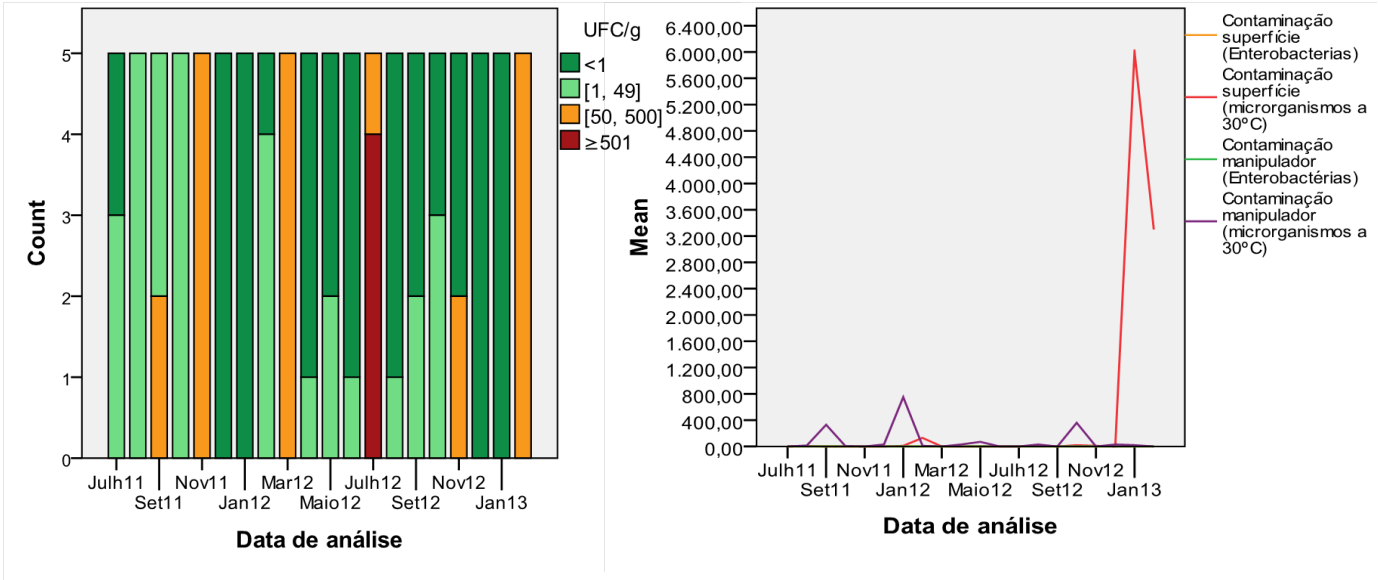
110. Perry, J. D., Freydière, A.M. (2006). The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 2046–2055.
111. Bettelheim, K. A. (1998). Studies of *Escherichia coli* cultured on Rainbow Agar O157 with particular reference to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Microbiol Immunol*. 42: 265–269.
112. Bettelheim, K.A. (1998). Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. *J Appl Microbiol*. 85: 425–428.
113. Bettelheim, K.A. (2005). Reliability of O157:H7 ID agar (O157 H7 ID-F) for the detection and isolation of verocytotoxigenic strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157. *J Appl Microbiol*. 99: 408–410.
114. Carney E., O'Brien S. B., Sheridan J. J., McDowell D. A., Blair I. S., Duffy G. (2006). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiology*. 23(1): 52-59.
115. Galland J. C. (1997). Risks and prevention of contamination of beef carcasses during the slaughter process in the United States of America, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 16(2): 395-404.
116. Borch E., Arinder P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*. 62(3): 381-390.
117. Bello M., Lawan M. K., Kwaga J. K. P., Raji M. A. (2011). Assessment of carcass contamination with *E. coli* O157 before and after washing with water at abattoirs in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*. 150(2–3): 184-186.
118. Eustace I., Midgley J., Giarrusso C., Laurent C., Jenson I., Sumner J. (2007). An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. *International Journal of Food Microbiology*. 113(1): 23-27.
119. Li Q., Sherwood J.S., Logue C. M. (2004). The prevalence of *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. *Food Microbiology*. 21(6): 791-799.
120. Gomes-Neves E., Cardoso C.S., Araújo A.C., Costa M.C., (2011). Meat handlers training in Portugal: A survey on knowledge and practice. *Food Control*. 22(3–4):501-7.
121. Haas C. N., Marie J. R., Rose J. B., Gerba C. P. (2005). Assessment of benefits from use of antimicrobial hand products: Reduction in risk from handling ground beef. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 208(6): 461-466.
122. F., Hakim S., Kamaluddin, Thong K.. (2012). *Clostridium perfringens* and Sulphite Reducing Clostridia Densities in Selected Tropical Malaysian Rivers. 43(1): 129-135.
123. Byrne B., Scannell A. G. M., Lyng, J., Bolton, D.J. (2008). An evaluation of *Clostridium perfringens* media. *Food Control*. 19(11): 1091-1095.
124. Juang D. F., Morgan J. M. (2001). The applicability of the API 20E and API Rapid NFT systems for the identification of bacteria from activated sludge. *Electronic Journal of Biotechnology*. 4(1): 18-24.
125. Villar R. G., Macek M.D., Simons S., Hayes P. S., Goldoft M.J., Rowan L. L., Hursh D., Patnode M., Mead P. S. (1999). Investigation of Multidrug-Resistant *Salmonella* Serotype Typhimurium DT 104 Infections Linked to Raw-Milk Cheese in Washington State. 281(9): 1811-1816.
126. Health Protection Agency (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London.
127. Balzaretti C.M., Marzano M.A. (2013). Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. *Food Control*. 29(1): 202-207.

**Anexo I – resultados relativos a enumeração de *E. coli* em carnes picadas dos diversos talhos, e enumeração de microrganismos a 30°C e enterobactérias em superfícies e manipuladores**

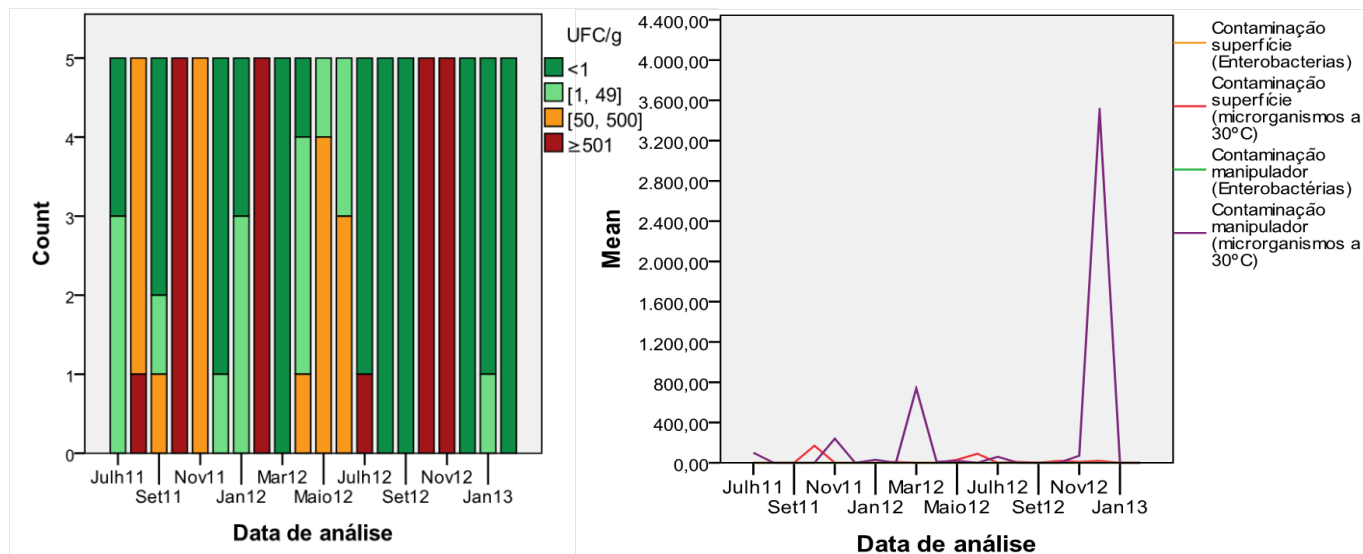
**Talho 3**



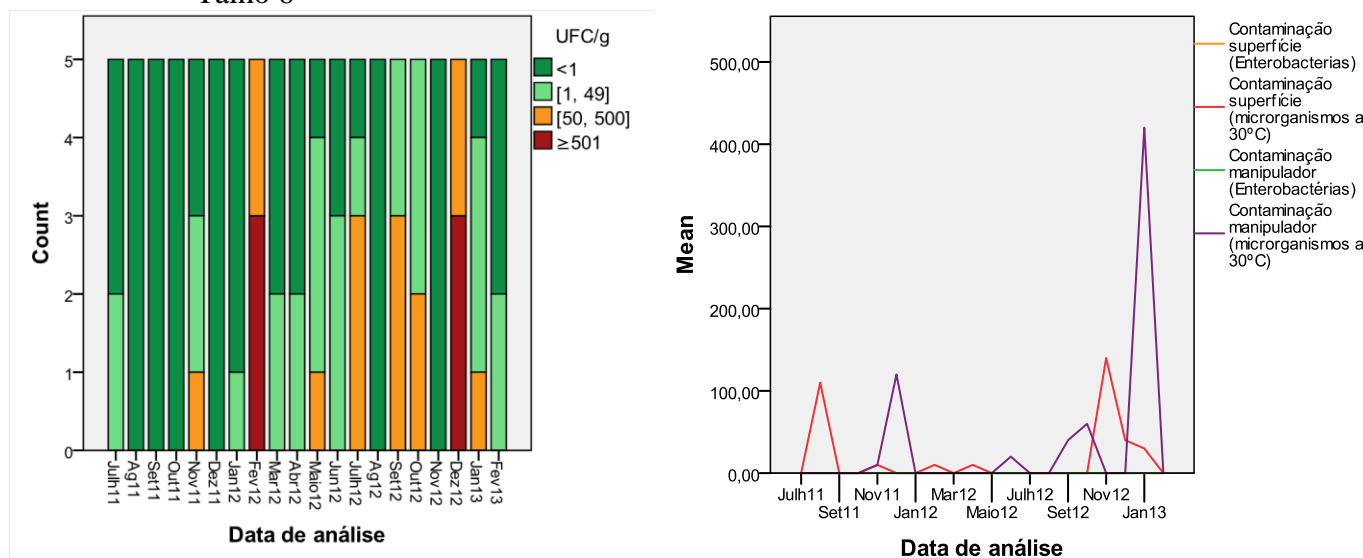
**Talho 4**



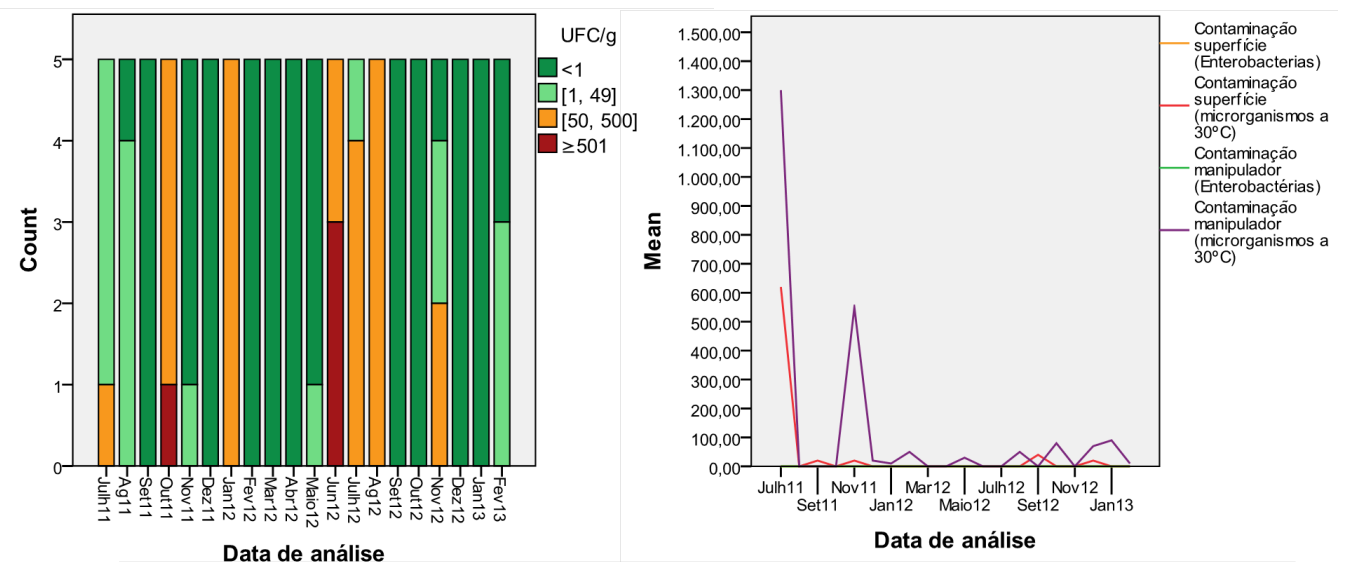
Talho 5



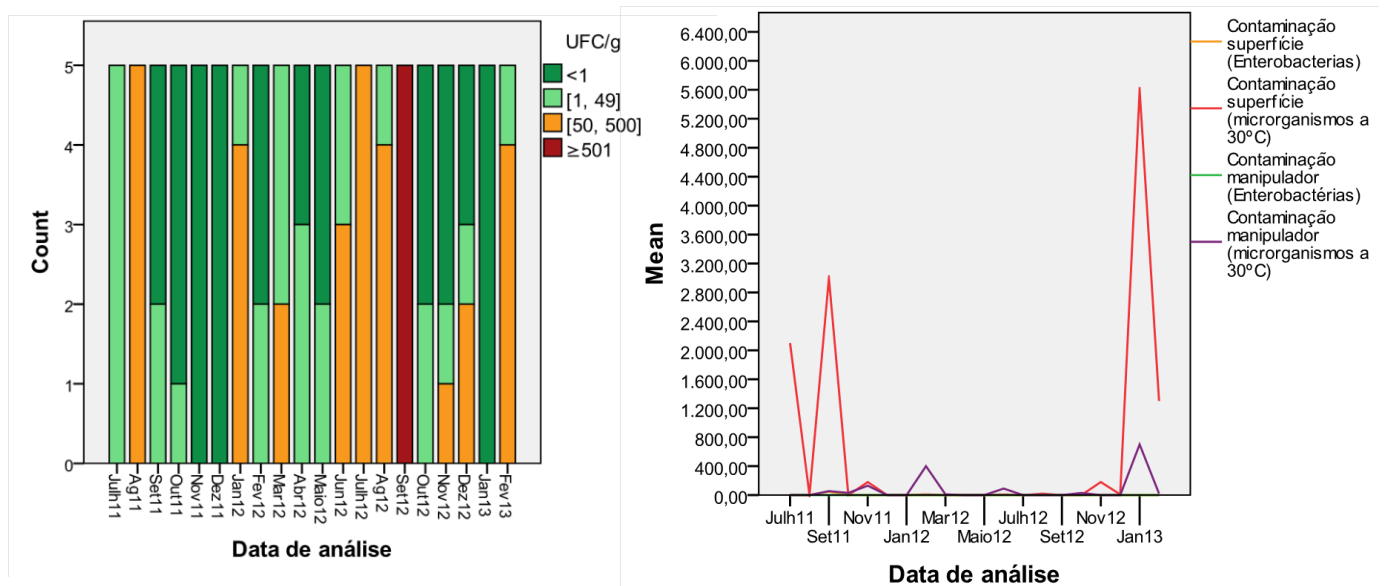
Talho 6



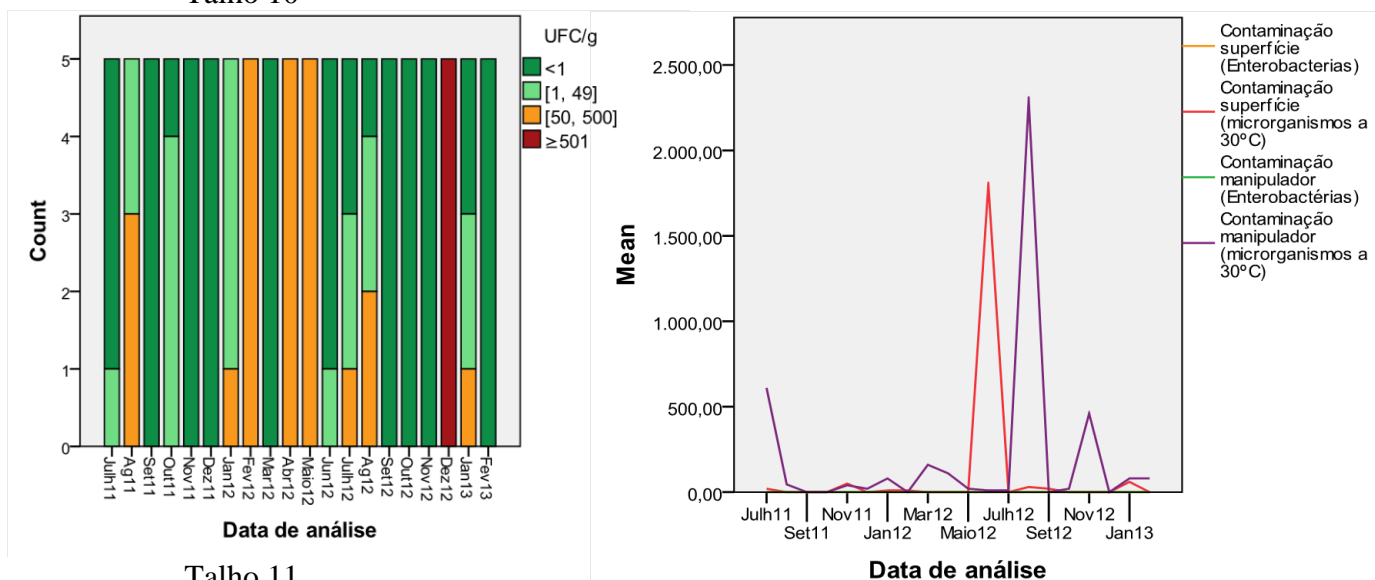
Talho 8



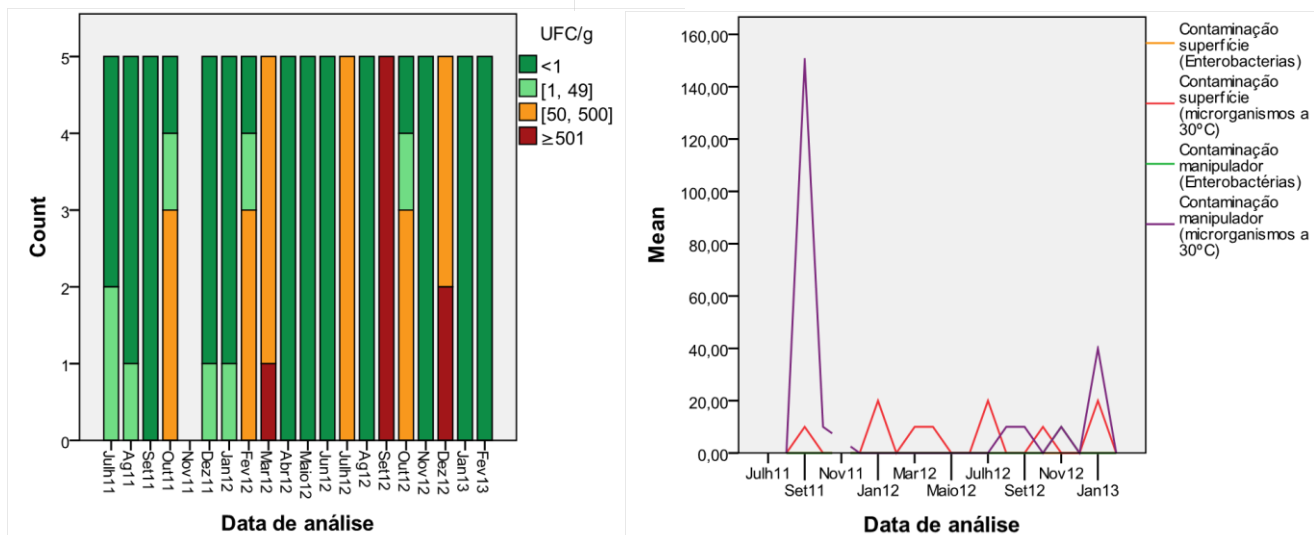
Talho 9



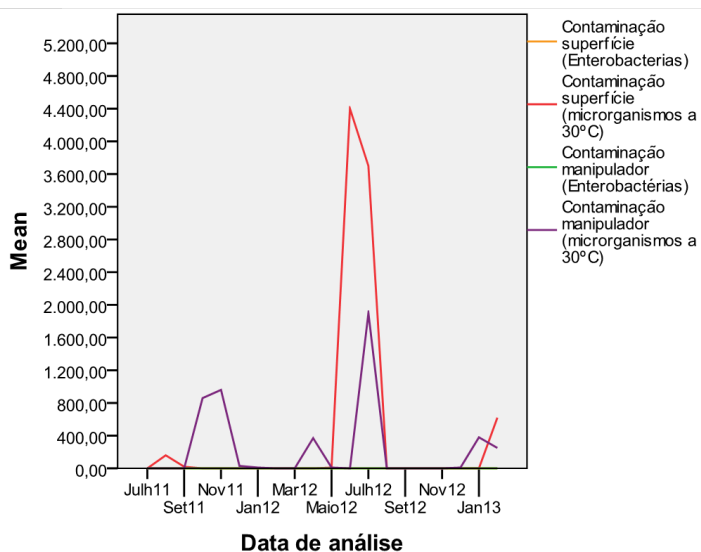
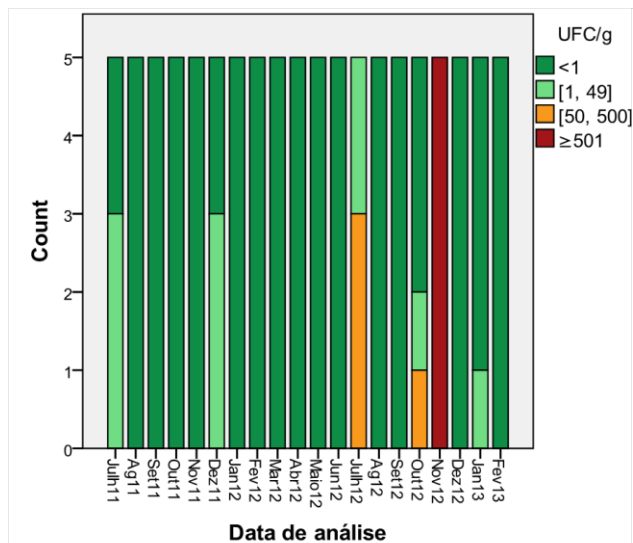
Talho 10



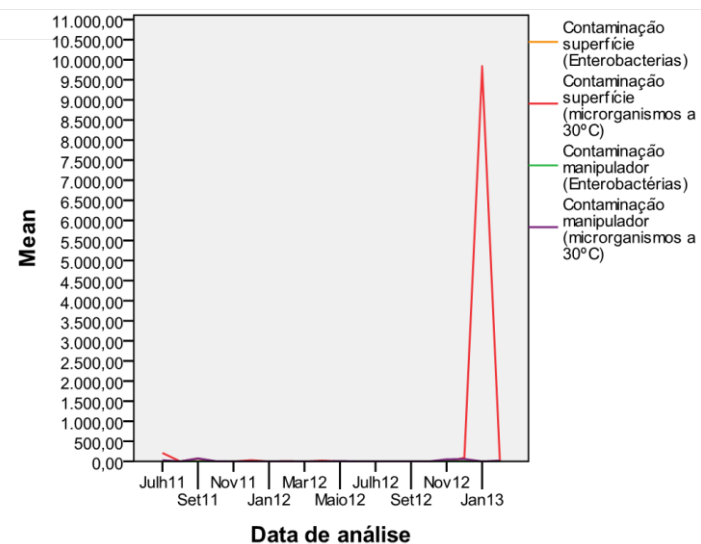
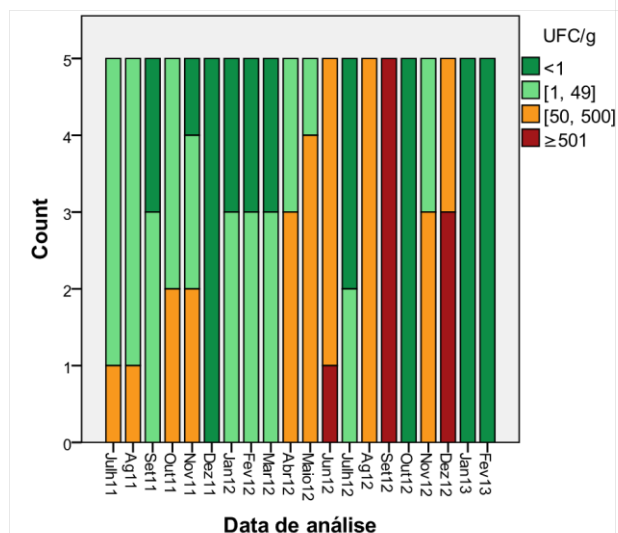
Talho 11



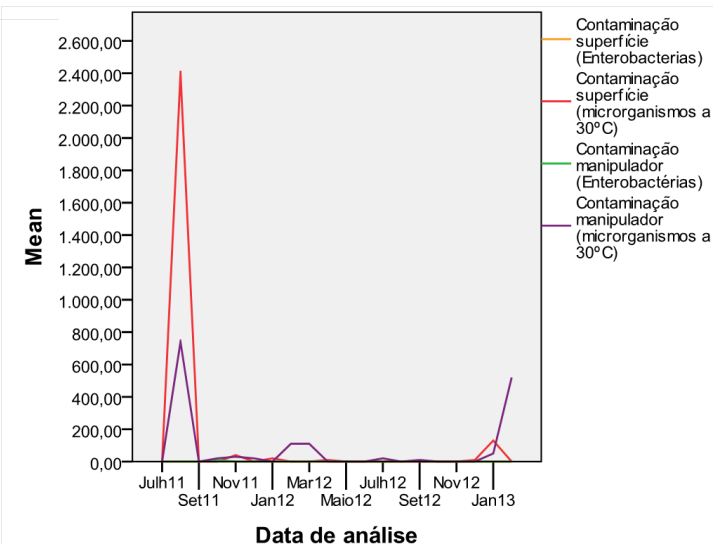
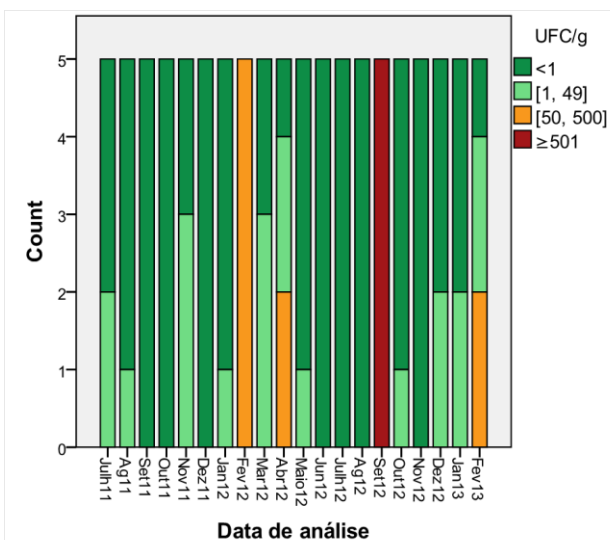
Talho 12



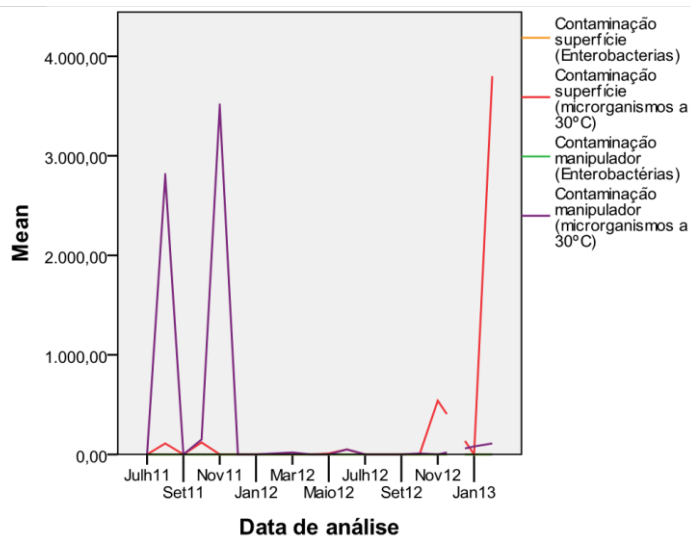
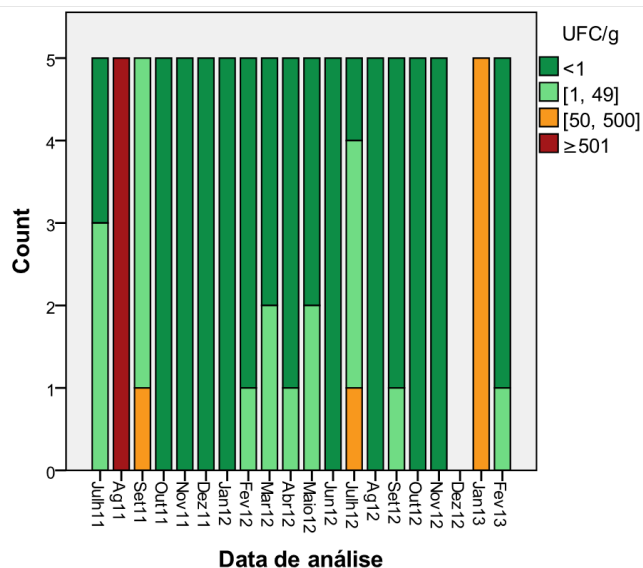
Talho 13



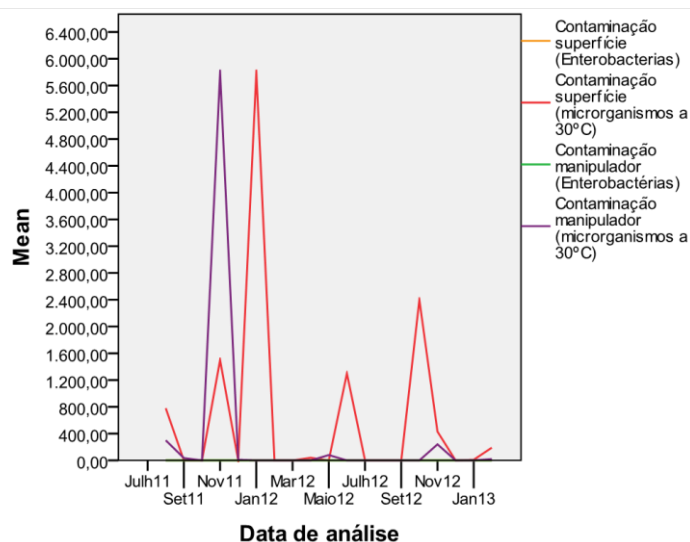
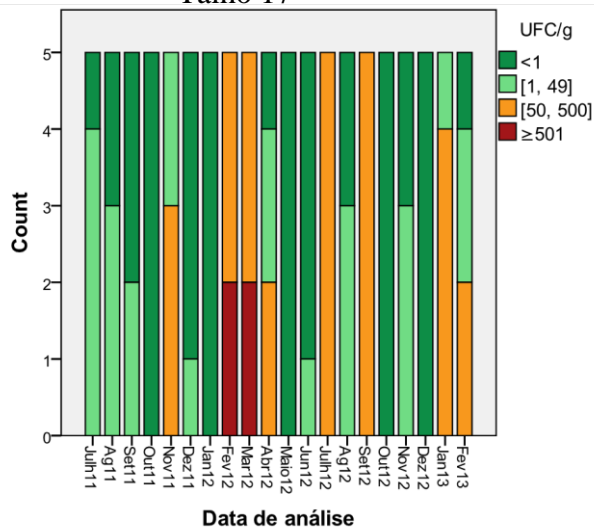
Talho 15



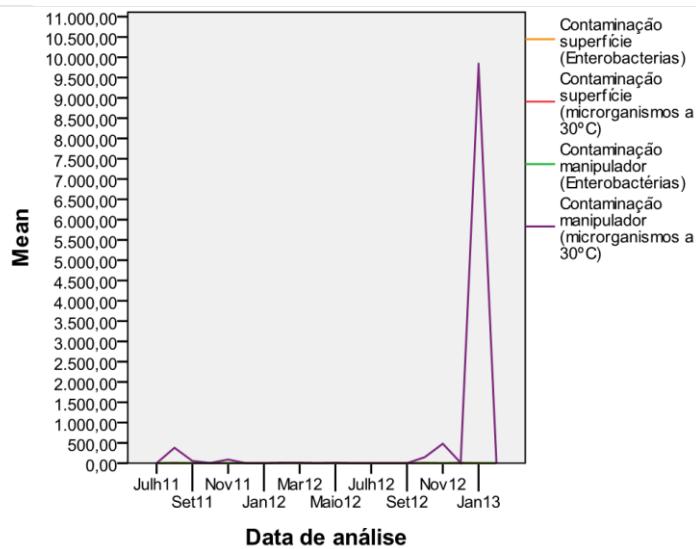
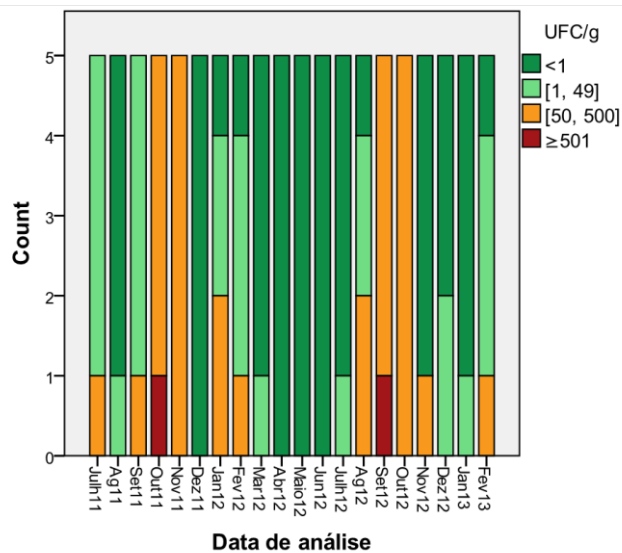
Talho 16



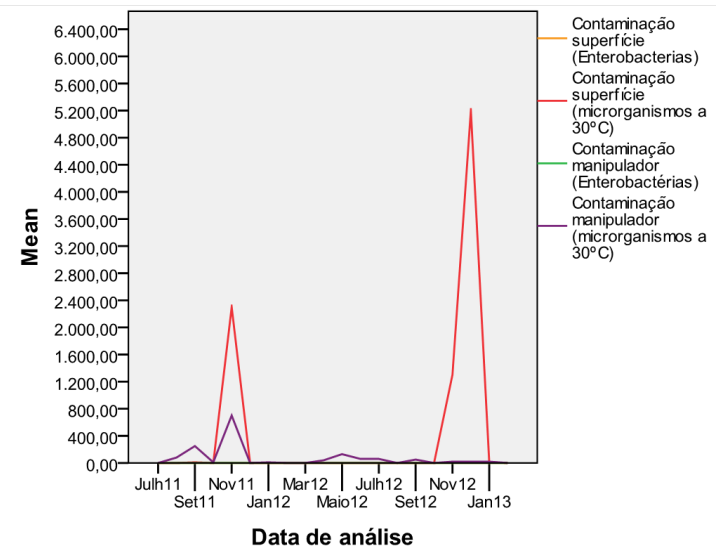
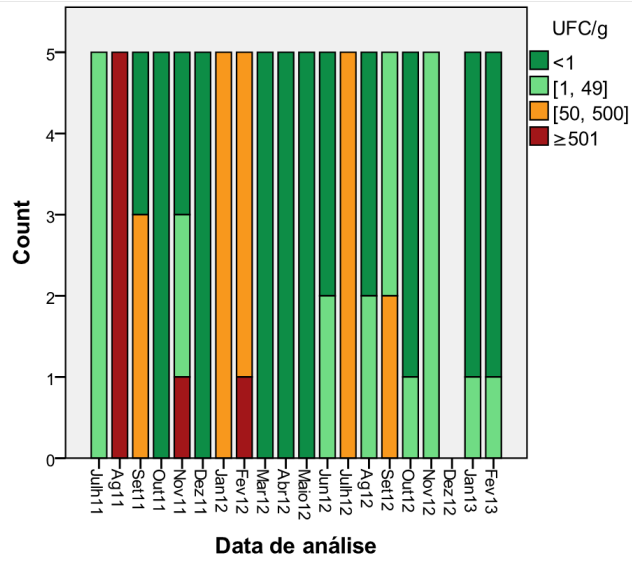
Talho 17



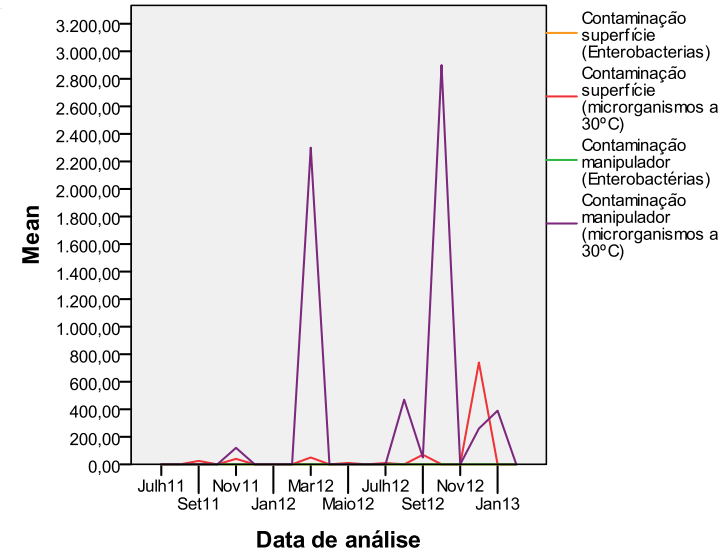
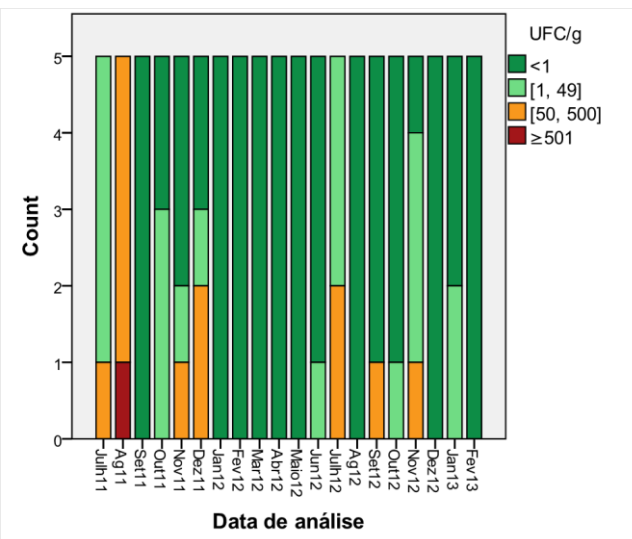
Talho 18



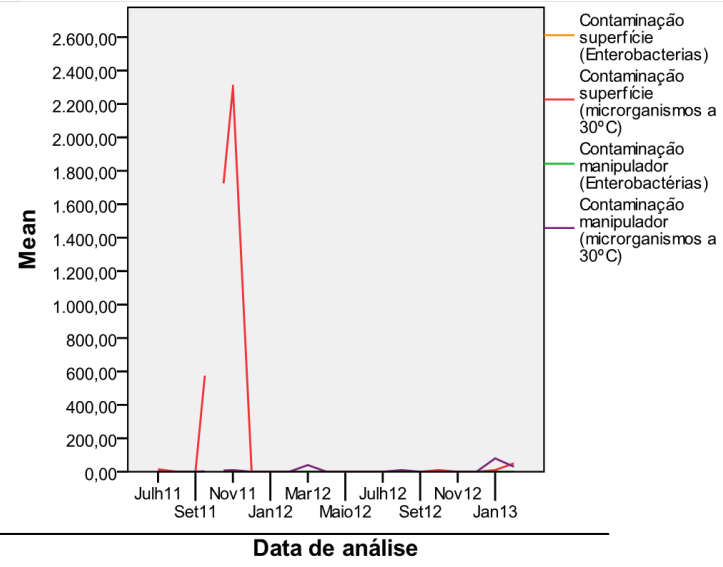
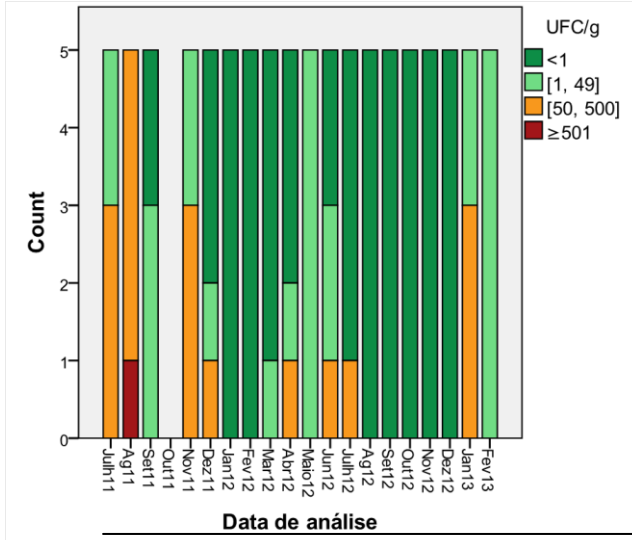
Talho 19



Talho 20

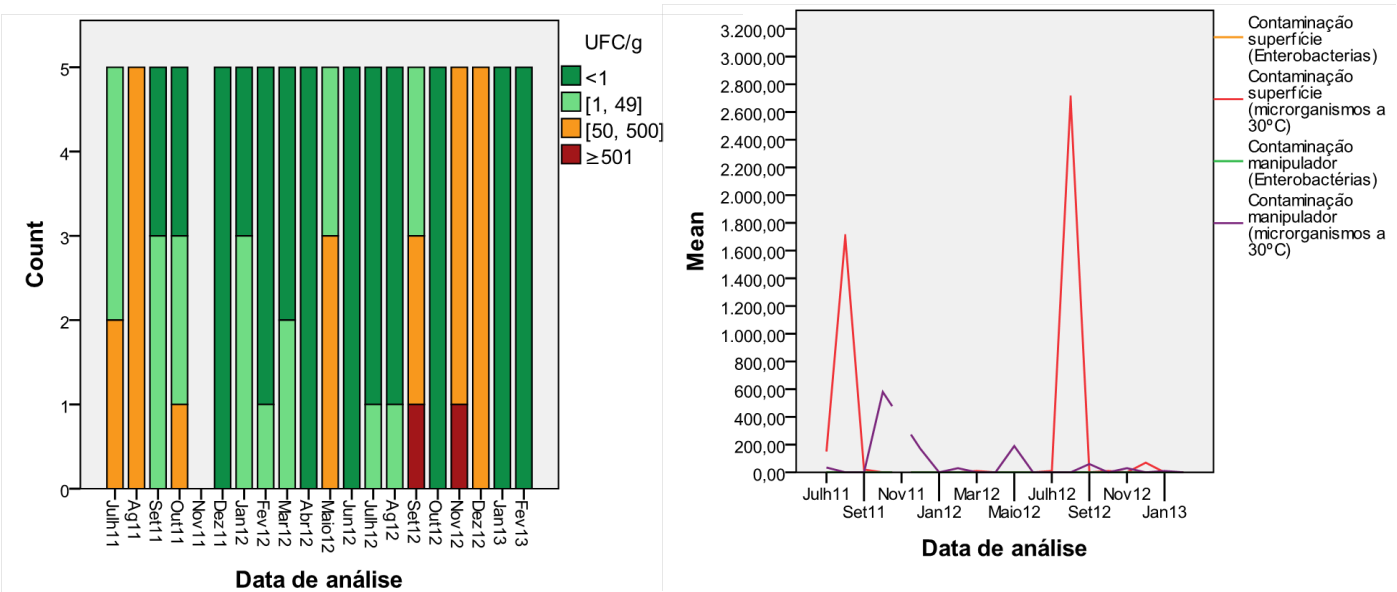


Talho 21

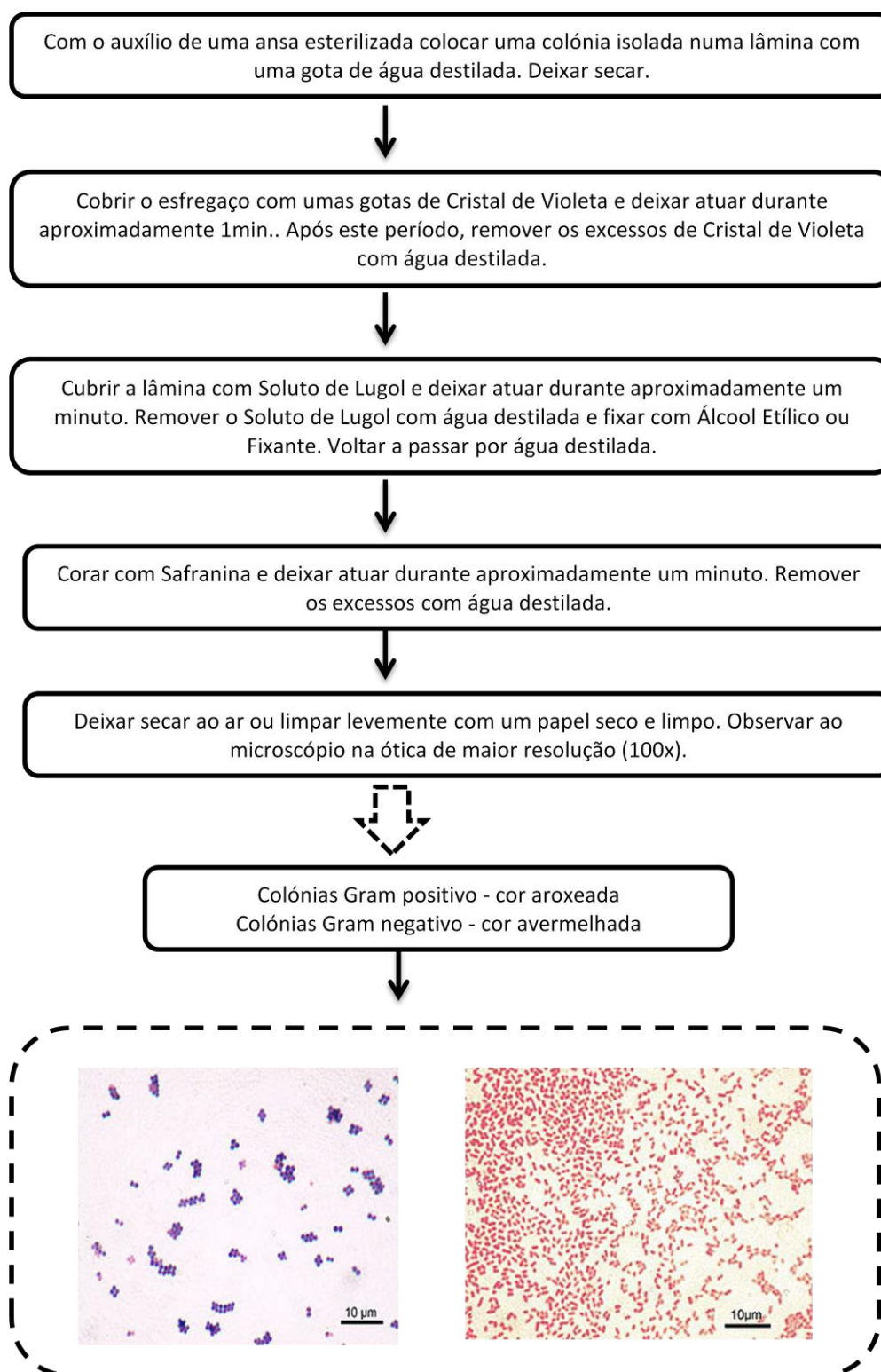




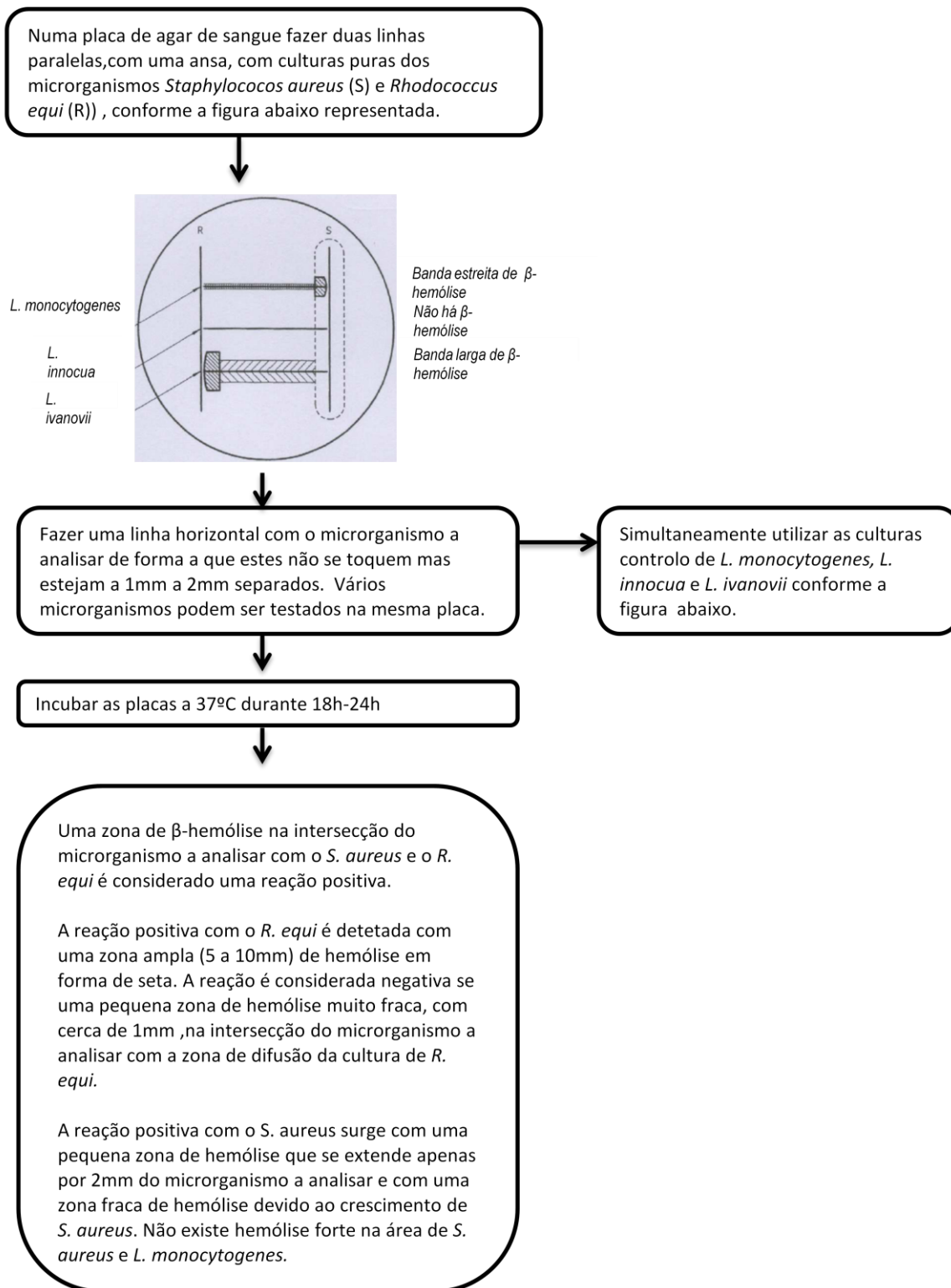
Talho 22



## Anexo II – Protocolo Experimental de Coloração de Gram



## Anexo III – Protocolo Experimental de Teste de CAMP



## Anexo IV – Protocolo Experimental de Teste Catalase

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur/palito esterilizado colocar uma pequena porção de cada colónia isolada numa gota de peróxido de hidrogénio num lamina. Se utilizar uma ansa de Cr-Ni testar primeiro a sua reacção ao peróxido de hidrogénio.

A formação imediata de bolhas de ar indicam uma reacção positiva.



Utilizar sempre um controlo positivo e negativo quando se realizar a Pesquisa de Catalase utilizando um Microrganismo de Referência. Utilizar por exemplo *Listeria monocytogenes* para controlo positivo e *Enterococcus faecalis* para controlo negativo.